

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

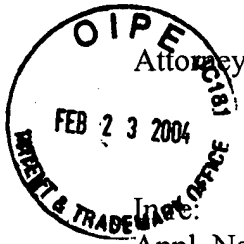
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Attorney's Docket No. 043774/268252

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventor: HUI
Appl. No.: 10/650,284
Filed: 08/28/2003
For: CELL PROLIFERATION FACTOR FWA267

Confirmation No.: 6701

February 19, 2004

Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

To complete the requirements of 35 U.S.C. § 119, enclosed is a certified copy of Chinese priority Application No. 01109260.2, filed February 28, 2001.

Respectfully submitted,

Melissa B. Pendleton
Registration No. 35,459

Customer No. 00826
Alston & Bird LLP
Bank of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
Tel Charlotte Office (704) 444-1000
Fax Charlotte Office (704) 444-1111

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on February 19, 2004.

Grace R. Rippey

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2001 02 28

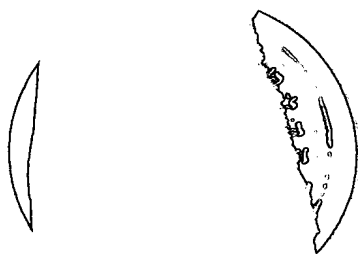
申 请 号： 01 1 09260.2

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 肌细胞增殖抑制因子 F w a 2 6 7

申 请 人： 中国医学科学院阜外心血管病医院

发明人或设计人： 惠汝太； 陈敬洲； 刘宝华； 刘玉清



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2003 年 8 月 22 日

权 利 要 求 书

1. 一种分离的多核苷酸，它包括选自下列组中的一个成员：

(a) 一种多核苷酸，其编码如 SEQ ID NO:2 所示的多肽；

5 (b) 一种多核苷酸，其是(a)天然存在的多核苷酸变异体；

(c) 一种多核苷酸，其能够与(a)杂交，并且与(a)具有至少 85%的同源性。

2. 权利要求 1 的多核苷酸，其中所说的多核苷酸是 DNA。

3. 权利要求 1 的多核苷酸，其中所说的多核苷酸是 RNA。

4. 权利要求 1 的多核苷酸，其中所说的多核苷酸是基因组 DNA。

10 5. 权利要求 1 的多核苷酸，所说的多核苷酸具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列。

6. 权利要求 1 的多核苷酸，所说的多核苷酸包含如 SEQ ID NO: 1 所示的从 107 至 1219 位核苷酸。

7. 权利要求 2 的多核苷酸，其编码如 SEQ ID NO: 2 所示的多肽。

15 8. 一种载体，所说的载体包含权利要求 2 的 DNA。

9. 一种宿主细胞，所说的宿主细胞由权利要求 8 的载体转化或者转染过。

10. 一种产生多肽的方法，所说的方法包括在权利要求 9 的宿主细胞中表达由所述 DNA 编码的多肽。

11. 一种多肽，它包含选自下列组中的一个成员：

20 (a) 一种多肽，其具有推定的如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列；

(b) 一种多肽，其是(a)的活性片段、类似物或衍生物；

(c) 一种多肽，其与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有至少 85%的同源性。

12. 一种权利要求 11 之多肽的抗体。

13. 一种化合物，所说的化合物抑制权利要求 11 之多肽的激活。

25 14. 一种药物组合物，所说的药物组合物包含有效量的权利要求 11 的多肽或其活性片段，以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

15. 权利要求 11 的多肽在制备治疗心脑血管疾病的药物组合物中的用途。

16. 一种治疗需要 Fwa267 之患者的方法，所说的方法包括：对患者施用治疗有效量的权利要求 11 的多肽。

17. 权利要求 16 的方法，所说的方法包括：向患者提供编码所述多肽的 DNA，并在患者体内表达所述的多肽。

5 18. 一种诊断疾病或者对疾病的易感性的方法，所说的方法包括：测定权利要求 1 的多核苷酸中的突变。

19. 一种诊断方法，所说的方法包括：分析来源于宿主细胞的样品中是否存在权利要求 11 的多肽。

说明书

肌细胞增殖抑制因子 Fwa267

本发明涉及最新鉴定的多核苷酸和由其编码的多肽，这种多核苷酸和多肽的生产方法以及这些多核苷酸和多肽的用途。本发明的多肽已被鉴定为肌细胞抑制因子，下文有时称为“Fwa267”。本发明的多核苷酸和多肽是人类来源的。

心脑血管病是威胁人类健康的重大疾病之一。据统计，每年约有 260 万中国人死于此病，平均每 12 秒就有一位同胞被该病夺去生命。在中国，心脑血管病死亡人数占总死亡人数的比率从 1957 年的 12.1% 上升至 1990 年的 35.8%，升高了 2.9 倍。据世界银行预测：到 2020 年，全世界心脑血管病死亡人数占总死亡人数的比率将从 1990 年的 28.9% 升至 36.3%，其中 70% 的心脑血管病发生在发展中国家。中国现有高血压患者 1 亿多人，并以每年 350 万人的速度递增；脑中风致残者 600 万人，并以每年 150 万的速度递增；冠心病患者 100 万人，并以每年 50 万的速度递增；此外，还有心肌病患者 300 万人。因此，心脑血管病的防治对减轻人类经济负担，确保人体健康具有十分重要的意义。

心脑血管病的治疗经历了四个大的阶段：1920 年代，循环动力学的研究揭示了心脏是一个“泵”，由此奠定了心力衰竭的治疗基础；60-70 年代，对心血管病危险因素的认识及处理，使西方国家心脏病的发病率下降了近 40%；1970 年，对心肌细胞电生理学的研究，提供了抗心律失常、电生理检查及治疗的新方法；80 年代末到 90 年代初，对血管生物学的认识，产生了心脏介入治疗的新方法。

心衰、抗心律失常、及介入治疗对抢救心脑血管病人的生命，提高其生活质量起到了积极作用。然而，由于这些方法仅针对症状进行治疗，没有从根本上触及病因，所以治疗针对性不强。虽然延长了病人的寿命，但没有真正达到预防和治愈的目的。因此，在分子生物学的水平进行研究，查明心脑血管病的致病因素及发病机理，有望在该病的治疗方面取得突破性进展，达到从根本上遏制心脑血管病的目的。

cDNA 文库是生物工程领域的重要研究工具之一。通常从细胞中提取 mRNA，通过反转录酶合成 mRNA 的 DNA 拷贝（即 cDNA，Complementary DNA）。单链 cDNA 分子在 DNA 聚合酶的作用转变成双链 DNA 分子，然后再插入载体，转化到宿主菌中长成克隆。这样的每个克隆只包含特定的 mRNA 信息，这样的一套克隆就称为 cDNA 文库。

由于 cDNA 不含内含子，从 cDNA 文库中可以直接筛选到相应的表达基因，故相对基因库而言，cDNA 文库具有操作简单、使用方便的优点。人体不同细胞表达基因的差异决定了

其组织和器官表型的差异，从人主动脉 cDNA 文库中分离和鉴定特异表达基因，特别是分离和鉴定疾病相关基因，是研究遗传性心血管病的有效方法之一。

按照本发明的一个方面，提供了一种新的成熟多肽 Fwa267 以及具有生物学活性并在诊断或治疗上有用途的 Fwa267 的片段、类似物和衍生物。本发明的多肽是人类来源的。

5 按照本发明的另一个方面，提供了编码本发明多肽的分离的核酸分子，包括 mRNA、DNA、cDNA、基因组 DNA，以及具有生物学活性并在诊断学或治疗学上有用途的该核酸分子的片段、类似物和衍生物。

按照本发明的另一个方面，提供了用重组技术生产 Fwa267 多肽的方法，该方法包括培养含有编码本发明多肽的核酸序列的重组原核和/或真核宿主细胞。

10 按照本发明的另一个方面，提供了将 Fwa267 多肽或编码 Fwa267 多肽的多核苷酸用于治疗的方法。例如，治疗心血管增生性疾病，抑制肿瘤形成。

按照本发明的另一个方面，提供了这些多肽的抗体。

按照本发明的另一个方面，提供了所述多肽的拮抗剂，其可用来抑制这些多肽的作用。

15 按照本发明的另一个方面，提供了与本发明核酸序列中的突变、以及与本发明的多肽异常表达有关的疾病或疾病易感性的诊断方法。

按照本发明的另一个方面，提供了将本发明的多肽或编码这种多肽的多核苷酸、在体外用于科学研究、DNA 合成以及人工构建 DNA 载体的方法。

根据本文的教导，上述方面及相关方面对本领域的技术人员而言是显而易见的。

20 本发明是通过如下技术方案实现的。提取 mRNA，反转录成 cDNA，构建成人主动脉 cDNA 文库。从文库中获取 Fwa267 的基因片段，通过 EST 拼接得到 Fwa267 的全长 cDNA 序列。进而研究 Fwa267 基因在不同组织的表达与分布，研究 Fwa267 多肽的活性与功能。

25 按照本发明的一个方面，本发明提供了一种分离的核酸(多核苷酸)序列，其编码具有推定的、如 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的成熟多肽。本发明的多核苷酸是从成人主动脉的 cDNA 文库中发现的。其定位于人体细胞的第 11 号染色体上。其包含一个开放阅读框架，可以编码具有 370 个氨基酸残基的多肽。同源性分析表明 Fwa267 多肽仅与分泌性生长因子 fallotein 显示出 46% 的同源性。

30 推测的 Fwa267 蛋白由 370 个氨基酸组成。其序列特征为：(A) 从 276 至 279 Aa (NYSV) 为 N-糖基化位点；(B) 从 268 至 271 Aa (KRYs) 为 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶位点；(C) 从 262 至 270 Aa (RLNDDAKRY) 为酪氨酸激酶位点；(D) 从 1 至 61Aa (MHRLIFVYTLICANFCSCRDTSATPQSASIKALRNANLRRDESNHLTDLYRRDETIQVKGN) 为 TonB 依赖的

受体蛋白信号 1: (E) 从 100 至 105 Aa (GLEEAE), 192 至 197 Aa (GVSYNS), 303 至 308 Aa (GGNCGC), 304 至 309 Aa (GNCGCG) 为豆蔻酰化位点; (F) 从 17 至 19 Aa (SCR), 29 至 31 Aa (SIK), 66 至 68 Aa (SPR), 80 至 82 Aa (TWR), 150 至 152 Aa (TFK), 243 至 245 Aa (TPR), 273 至 275 Aa (TPR), 243 至 245 Aa (TPR), 273 至 275 Aa (TPR), 320 至 322 Aa (SGK) 5 为蛋白激酶 C 位点。(G) 从 17 至 20 Aa (SCRD), 168 至 171 Aa (SLLE), 181 至 184 Aa (TNWE), 199 至 202 Aa (SVTD), 219 至 222 Aa (TVED), 231 至 234 Aa (SWQE), 250 至 253 Aa (SYHD), 256 至 259 Aa (SKVD) 为酪蛋白激酶 II 位点。

本发明的多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 形式, 其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA。DNA 可以是双链或单链的, 如果是单链的, 则可以是编码链或非编码(反义)链。编码成熟多肽的编码序列可以和 SIQ ID NO: 1 (全长 3739 个核苷酸) 所示的编码序列(107 10 至 1219 位核苷酸) 相同; 或者, 由于遗传密码的丰余性或简并性, 编码序列也可以不同与 SIQ ID NO: 1 所示的编码序列。

编码 SIQ ID NO: 2 所示成熟多肽的多核苷酸可以包括: 成熟多肽的编码序列; 成熟多肽的编码序列和附加的编码序列, 如编码多肽前导序列或分泌序列的多核苷酸; 成熟多肽的 15 编码序列(以及任选的附加编码序列) 和非编码序列, 如内含子或成熟多肽编码序列 5' 和/或 3' 端的非编码序列。

因此, 术语“编码多肽的多核苷酸”包括仅含有多肽编码序列的多核苷酸以及含有附加的编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 其编码推定的、具有 SIQ ID NO: 2 所示氨基酸 20 序列的多肽片段、类似物及衍生物。所述变异体可以是天然产生的该多核苷酸的等位基因变异体, 或者是非天然产生的变异体。正如本领域已知的, 等位基因变异体是一段多核苷酸的另一种形式, 其可以带有一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加, 而实质上不改变所编码多肽的功能。

因此, 本发明包括能够编码与 SIQ ID NO: 2 所示成熟多肽具有相同氨基酸序列的多核苷酸, 还包括能够编码 SIQ ID NO: 2 所示成熟多肽之片段、衍生物和类似物的多核苷酸变 25 异体。这些变异体包括缺失变异体、取代变异体、添加或插入变异体。

本发明也包括这样的多核苷酸, 其中成熟多肽的编码序列可以在相同的阅读框架中, 与有助于多肽由宿主细胞表达及分泌的多核苷酸(如产生前导序列的多核苷酸) 相融合。前导序列作为分泌序列而控制多肽从细胞中转运。具有前导序列的多肽是前体蛋白 30 (preprotein), 由宿主细胞切割其前导序列后可以产生成熟多肽。本发明的多核苷酸也可以

编码蛋白原(proprotein)，蛋白原是具有原序列(prosequence)的成熟蛋白，是 5'端附加了氨基酸残基的成熟蛋白，是一种无活性形式。切除原序列后，可以产生有活性的成熟蛋白。

因此，本发明的多核苷酸可以编码一种成熟蛋白，也可以编码具有原序列的蛋白，还可以编码既有原序列(prosequence)又有前导序列(presequence)的蛋白质。

5 本发明的多核苷酸还包括在同一读框中与标记序列融合的编码序列，标记序列可用于纯化本发明的多肽。例如，当宿主细胞为细菌时，标记序列可以是由 pQE-9 载体提供的、用于纯化融合产物的六组氨酸。或者，当宿主为哺乳动物细胞(如 COS-7 细胞)时，标记序列可以是血细胞凝集素(HA)，HA 标记对应于从流感血凝集蛋白衍生的一个表位(Wilson, I., 等, 细胞, 37 :767(1984))。

10 术语“基因”是指与产生多肽有关的 DNA 片段，其包括编码区之前和之后的区域，以及在各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

本发明全长基因的片段可以用作 cDNA 文库的杂交探针，用来分离全长基因和与该基因有高度同源性或相似生物活性的其它基因。所说的探针优选具有至少 30 个碱基，并且可以含有 50 个或更多个碱基。所述探针也可以用来鉴别相应于全长转录物的 cDNA 克隆和含有完
15 整基因的一个或多个基因组克隆。其中，完整基因包括调节序列、启动子序列、外显子和内含子。例如可以根据已知的 DNA 序列合成寡核苷酸探针，进而分离出基因的编码部分。与本发明基因序列互补的、标记的寡核苷酸探针可以用来从人类 cDNA、基因组 DNA 或 mRNA 文库中筛选与其杂交的文库成员。

本发明还涉及与本发明的多核苷酸杂交的核酸序列。条件是两个序列间具有至少 85%，
20 优选至少 90%，更优选至少 95%的同源性。本发明特别涉及在严格条件下与本发明的多核苷酸杂交的多核苷酸。本文所用术语“严格条件”是指仅在序列间具有至少 95%，优选具有至少 97%的同源性时杂交才会发生。与上述序列杂交的多核苷酸可以编码与本发明成熟多肽具有相同生物学功能或活性的多肽。

此外，与本发明的多核苷酸具有同源性并能够杂交的多核苷酸可以具有至少 20 个碱基，
25 优选至少 30 个碱基，更优选至少 50 个碱基，其可以保留或不保留活性。这样的多核苷酸可以用作 SEQ ID NO:1 的探针，用于回收多核苷酸、作为诊断探针或作为 PCR 引物。

因此，本发明涉及与编码 SEQ ID NO: 2 所示多肽的多核苷酸具有至少 85%，优选至少 90%，更优选至少 95%同源性的多核苷酸及其片段(所述片段具有至少 30 个碱基，优选至少 50 个碱基)，以及由这些多核苷酸编码的多肽。

30 根据本发明的另一个发明，本发明涉及推定的、具有 SIQ ID NO:2 所示氨基酸序列的

多肽及其片段、类似物和衍生物。

术语“片段”、“衍生物”和“类似物”，当涉及由 SIQ ID NO: 1 编码的多肽或者具有如 SIQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽时，是指基本上保留了所述多肽生物学功能或活性的多肽。所说的类似物可以包括蛋白原，蛋白原经部分切除后可以产生有活性的成熟多肽。

5 本发明的多肽可以是重组多肽，天然多肽或合成多肽，优选重组多肽。

所说的多肽(SIQ ID NO: 2)及其片段、衍生物或类似物可以是:(i)一种多肽，其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守的氨基酸残基(优选保守的氨基酸残基)取代，并且被取代的氨基酸残基可以是或不是由遗传密码子编码的，或者(ii)一种多肽，其中一个或多个氨基酸残基包含取代基，或者(iii)一种多肽，其中成熟多肽与另一种化合物融合，如与增加多肽半衰期的化合物(例如聚乙烯乙二醇)融合，或者(iv)一种多肽，其中成熟多肽与附加氨基酸残基融合，例如与前导或分泌序列融合，又如与用来纯化成熟多肽的序列融合。通过本文的教导，这样的片段、衍生物及类似物可视为在本领域技术人员知识范围内。

本发明的多肽和多核苷酸优选以分离形式提供的，并且优选将其纯化成为均一(同质)物质。

15 术语“分离的”是指所述物质脱离了原始环境(例如，如果该物质是天然存在的，则指天然环境)。例如，一种在活体动物中天然存在的多核苷酸或多肽不是分离的，但从天然系统中部分或全部共存物质中分离出同样的多核苷酸或多肽则是分离的。这样的多核苷酸可以是载体的一部分，这样的多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分，只要这种载体或者组合物不是其天然环境的一部分。

20 本发明的多肽包括 SEQ ID NO: 2 所示的多肽(特别是成熟多肽)以及与 SEQ ID NO: 2 的多肽具有至少 85%的同源性，更优选 90%的同源性，最优选 95%的同源性的多肽。本发明还包括上述多肽的片段，多肽片段通常包含至少 30 个，优选至少 50 个氨基酸。

如本领域所熟知的，两个多肽之间的“同源性”是通过将一个多肽的氨基酸序列及其保守氨基酸取代与另一个多肽比较而确定的。

25 通过多肽合成，本发明的多肽片段(或部分多肽)可用于生产全长多肽。此片段可用作产生全长多肽的中间体。同样的，本发明的多核苷酸片段可以用于合成本发明的全长多核苷酸。

根据本发明的另一个方面，涉及含有本发明多核苷酸的载体，用本发明的载体基因工程化的宿主细胞，以及通过重组技术产生本发明多肽的方法。

30 宿主细胞是用本发明的载体经基因工程化(转导、转化或转染)而产生的。所说的载体

可以是克隆或表达载体。载体可以是质粒、病毒颗粒和噬菌体等形式。工程宿主细胞可以在经改良适于激活启动子、筛选转化体或扩增本发明 Fwa267 基因的常规营养培养基中培养。培养条件（如温度和 pH 值）是由不同的宿主细胞决定的，这些对本领域技术人员而言是显而易见的。

5 通过重组技术，本发明的多核苷酸可以用于生产多肽。多核苷酸可以包含在任何一种适于表达多肽的载体中。这样的载体包括染色体来源的、非染色体来源的和合成的 DNA 序列。例如 SV40 衍生物，细菌质粒，噬菌体 DNA，杆状病毒，酵母质粒，从质粒和噬菌体 DNA 结合得到的载体，病毒 DNA（如牛痘、腺病毒、家禽痘病毒、和假狂犬病病毒）。此外，还可以使用其它载体，只要其可以在宿主中复制并存活。

10 可以用多种方法将合适的 DNA 序列插入到载体中。一般来说，是用本领域已知的方法将 DNA 序列插入到适当的限制性核酸内切酶位点中。

表达载体中的 DNA 序列可以与适当的表达控制序列（启动子）连接，以指导 mRNA 的合成。启动子的例子有：LTR 或 SV 40 启动子，大肠杆菌的 *lac* 或 *trp*，噬菌体 λ P_L 启动子，以及已知其它的、控制原核或真核细胞或其病毒中基因表达的启动子。表达载体也以包含指导
15 翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。载体还可以包含用于扩增表达的合适序列。

此外，优选的表达载体包含一个或多个选择标记基因，以便为转化后宿主细胞的筛选提供表型特征。例如用于真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性，或者如用于大肠杆菌的四环素和氨苄青霉素抗性。

含有上述合适的 DNA 序列以及合适的启动子或者调控序列的载体可以用于转化适当的
20 宿主，以使其表达蛋白质。

作为合适宿主的代表性例子有：细菌细胞，如大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌；真菌细胞，如酵母；昆虫细胞如 *Drosophila S2* 和 *Spodoptera Sf9*；动物细胞如 CHO、COS 或 Bowes 黑素瘤；腺病毒；植物细胞等。通过本文的教导，选择合适的宿主可视为在本领域技术人员的知识范围内。

25 更具体地说，本发明还包括含有以上广泛描述的一种或多种序列的重组构建体。构建体包括正向或反向插入了本发明核酸序列的载体，如质粒或病毒载体。在更为理想的实施方案中，构建体还包含了可操作地与所述序列连接的调节序列，如启动子。许多合适的载体和启动子是本领域技术人员熟知的，并可以通过商业途径获得。例如，细菌载体：pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、
30 pNH18A、pNH46A (Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRITS (Pharmacia)；

真核载体：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Parmacia)。此外，还可以使用其它的质粒或载体，只要它们能够在宿主中复制并存活。

可以用带有 CAT(氯霉素转移酶) 或其它选择标记的载体从基因中选择启动子区。两个合适的载体是 PKK232-8 和 PCM7。特别提到的细菌启动子包括 lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λP_R 、 P_L 和 trp。真核启动子包括 CMV 立即早期，SV 胸苷激酶，早期和晚期 SV40、来自逆转录病毒的 LTRs 和小鼠金属硫蛋白-I。选择适当的载体与启动子可视作在本领域技术人员的知识范围内。

在另一个实施方案中，本发明涉及包含上述构建体的宿主细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞(如哺乳动物细胞)，或低等真核细胞(如酵母细胞)，或者是原核细胞(如细菌细胞)。通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔法可以实现构建体向宿主细胞的导入(Davis, L., Dibner, M., Battey, I., 分子生物学中的基本方法, (1986))。

宿主细胞中的构建体可以经由常规方式产生由重组序列编码的产物。而且，本发明的多肽可以用常规的多肽合成仪合成。

在合适启动子的控制下，成熟蛋白可以在哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞或其它细胞中表达。用来源于本发明 DNA 构建体的 RNA，通过无细胞翻译系统也可以产生目的蛋白。Sambrook 等人在《分子克隆实验室手册》中(1989，第二版，纽约冷泉港实验室)描述了可用于原核和真核宿主的、合适的克隆及表达载体。

通过向载体中插入增强子序列，可以提高高等真核生物细胞对编码本发明多肽的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件，一般约 10 至 300 bp，它作用于启动子以增强其转录。增强子的例子有：复制起点上游 100 至 270 bp 的 SV40 增强子、多形瘤增强子以及腺病毒增强子。

一般地，重组表达载体包括复制起点和筛选标记基因(如大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因和啤酒糖酵母的 TRP1 基因)，以及从高度表达的基因中得到、能够指导下游结构基因转录的启动子。这样的启动子可以从编码糖酵解酶(例如 3-磷酸甘油酸激酶(PGK))、 α -因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白等的操纵子中得到。异源序列以恰当的方式与翻译起始序列及终止序列装配。优选地，与能够指导蛋白向细胞周质或细胞外培养基分泌的前导序列装配。异源序列可以编码含有 N-末端识别肽的融合蛋白，该识别肽具有理想的特征，如稳定表达的重组产物或者简化纯化步骤。

将编码目的蛋白的结构基因，合适的翻译起始和终止信号，以及有功能的启动子一起插入，可以构建适用于细菌的表达载体。所说载体包含一个或多个选择标记和一个复制起点，

以维持载体并在必要时在宿主中扩增载体。适合转化的原核宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属的多个种。

作为代表性但非限制性的例子，用于细菌的表达载体可以含有源自市售载体的选择标记和复制起点，这些市售载体包含公知的克隆载体 pBR322(ATCC37017)的遗传元件。这样的市售载体包括，pKK223-3(Pharmacia Fine 化学品公司，Uppsala，瑞典)和 GEM1(Promega Biotec，Madison，WI，美国)。这些 pBR322 “骨架”部分与适当的启动子和待表达的结构序列相结合。

转化合适的宿主菌株，待其生长至合适的细胞密度后，用恰当的方法(例如温度变换或化学诱导)诱导选择的启动子，并继续培养细胞一段时间。常用离心法收获细胞，用物理或化学方法破碎细胞，保留得到的粗产物以进一步纯化。可以用任一种常规的方法破碎微生物细胞，所述方法包括冻融法、超声处理、机械破碎或使用细胞裂解剂，这些方法是本领域技术人员熟知的。

各种哺乳动物细胞培养系统也可用于表达重组蛋白质。哺乳动物表达系统的例子有由 Gluzman(细胞，23:175(1981))描述的猴肾成纤维细胞 COS-7 细胞系和能够表达相容载体的其它细胞系，例如，C127，3T3，CHO，HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体包含复制起点、适合的启动子和增强子，以及任何必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和 5'侧翼非转录序列。从 SV40 病毒基因组中得到的 DNA 序列，如 SV40 复制起点、早期启动子、增强子、剪接及多聚腺苷酸化位点可用来提供所需要的非转录遗传元件。

可以用多种方法从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的多肽，所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析、植物凝集素层析和高效液相色谱层析(HPLC)。

本发明的多肽可以是天然纯化的，或是化学合成的，或是用重组技术从原核或真核宿主(例如细菌、酵母、高等植物、培养的昆虫和哺乳动物细胞)制备的。根据重组方法中使用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的或非糖基化的。本发明的多肽也可以包含一个起始的甲硫氨酸残基。

本发明的多核苷酸和多肽可以用作人类疾病的治疗和诊断的研究试剂和材料。Fwa267可以抑制心肌细胞和平滑肌细胞的增殖。在正常情况下，其可能参与维持心肌细胞的终末分化。过渡表达 Fwa267 可能会诱发心肌细胞调亡坏死(如室壁瘤)，低水平表达则可能导致肌细胞增生。

根据本发明的另一方面，提供了鉴定本发明多肽激活剂或拮抗剂的方法。方法之一是在某种化合物存在的情况下，将表达 Fwa267 受体的哺乳动物细胞或膜制剂与 Fwa267 多肽一起培养，检测该化合物增强或阻断 Fwa267 多肽与受体相互作用后产生第二信使的能力。第二信使系统包括但不限于：蛋白酪氨酸激酶系统（PTK）、cAMP 鸟苷酸环化酶、离子通道或磷酸肌醇水解作用。鉴定多肽拮抗剂的另一种方法是竞争抑制法。该法将某化合物不存在时，与受体结合的 Fwa267 多肽分子数设为对照，通过检测该化合物存在时，与受体结合的 Fwa267 多肽分子数的变化来确定潜在的拮抗剂。

潜在的拮抗剂包括抗体，或者在某些情况下包括与本发明多肽结合的寡肽，它们与所述多肽结合并有效地消除其功能。

另一个潜在的拮抗剂化合物是用反义技术制备的反义构建体。通过三股螺旋形成反义 DNA 或 RNA 从而控制基因的表达，上述方法均基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如，可以依据编码本发明成熟多肽的核酸序列 5'端，设计长约 10 至 40 个碱基对的反义 RNA。又如设计一种与转录涉及的基因区互补的 DNA（三螺旋-参见 Lee 等，核酸研究，6:3073(1979)；Cooney 等，科学，241:456, (1988)；和 Dervan 等，科学，251 :1360(1991))，从而阻止转录以及本发明多肽的产生。反义 RNA 在体内和 mRNA 杂交，并阻断 mRNA 分子翻译成为本发明的多肽（反义-Okano, J. 神经化学杂志，56 :560(1991)；作为基因表达反义抑制剂的脱氧寡核苷酸(CRC 出版社，Boca Raton, FL(1988))。可以将上述寡核苷酸传送至细胞，从而在体内表达反义 RNA 和 DNA 以抑制本发明多肽的产生。

拮抗剂还包括一些小分子，这些小分子通过与本发明的多肽结合而阻止多肽与其受体的相互作用，从而阻断其正常的生物活性。小分子包括但不限于小肽或类肽分子。

本发明的多肽、其激活剂和拮抗剂可以与合适的载体结合形成药物组合物。这样的组合物包含治疗有效量的多肽和药学上可接受的载体或赋形剂。载体包括但不限于盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇以及上述物质的组合。其配方应与给药的方式相宜。

本发明还提供了一种药物包装或试剂盒，其内装有一个或多个容器，容器内装有本发明药物组合物的一种或多种组分。与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核的、有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。本发明的药物组合物还可以与其它的治疗化合物结合使用。

药物组合物可以按常规方式给药，如口服、局部、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、鼻内或真皮内途径。以治疗和/或预防特定疾病有效的剂量施用药物组合物。通常以至少大约 10 微克/千克体重的量给药。在大多数情况下，以不超过每天约 8 毫克/千克体重的量给药。

在大多数情况之下，考虑到用药途径和症状等因素，给药剂量从每日大约 10 微克/千克到 1 毫克/千克体重。

根据本发明的另一方面，可以通过在体内表达的方式使用本发明的多肽及其激活剂和拮抗剂，这种方式常被称作“基因治疗”。

5 因此，可以在体外用编码本发明多肽的核酸(DNA 或者 RNA)对患者细胞进行基因工程化处理，再将工程化的细胞提供给需要治疗的患者。上述方法是本领域熟知的。例如，可以用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒对细胞进行基因工程化处理。

类似的，可以通过本领域已知的方法在体内基因工程化细胞，以便在体内表达多肽。例如，用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒转导包装细胞，以使其能够产生含有目的
10 基因的感染性病毒颗粒。将这种生产细胞用于患者，从而在体内工程化细胞并表达所说的多肽。根据本发明的教导，通过上述方法或其它方式施用本发明的多肽对本领域技术人员而言是显而易见的。

可以得到逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于：莫洛尼氏(Moloney)鼠白血病病毒、脾坏死病毒、反转录病毒如劳氏(Rous)肉瘤病毒、Harvey 肉瘤病毒、禽白血病病毒、
15 长臂猿白血病病毒、人类免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓增生肉瘤病毒和乳房肿瘤病毒。

所述载体包含一个或多个启动子。可使用的合适启动子包括但不限于：反转录病毒 LTR；SV 40 启动子；人巨细胞病毒(CMV)启动子(Miller 等，生物技术，Vol. 7, No. 9, 980-990(1989)描述)；或其它启动子(例如真核细胞启动子，包括但不限于组蛋白、pol III 和β-肌动蛋白启动子)。其它可采用的病毒启动子包括但不限于：腺病毒启动子、胸苷激酶(TK)
20 启动子和 B19 细小病毒启动子。通过本文的教导，选择载体上合适的启动子对本领域技术人员而言是显而易见的。

编码本发明多肽的核酸序列应当有合适的启动子控制。可以使用的合适的启动子包括但不限于：腺病毒启动子(如腺病毒主要晚期启动子)；或者异源启动子(如巨细胞病毒(CMV)启动子)；呼吸合胞体病毒(RSV)启动子；可诱导的启动子(如 MMT 启动子、金属硫蛋白启动子)；
25 热休克启动子；清蛋白启动子；ApoAI 启动子；人类珠蛋白启动子；病毒胸苷激酶启动子(如单纯疱疹胸苷激酶启动子)；反转录病毒 LTRs(包括上文描述的修饰的反转录病毒 LTRs)；β-肌动蛋白启动子和人类生长激素启动子。启动子也可以是编码所述多肽的基因的天然启动子。

可以用反转录病毒质粒载体转导包装细胞以产生生产细胞。可被转染的包装细胞包括
30 但不限于：PE501、PA317、ψ-2、ψ-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、ψCRE、ψCRIP、GP+E-86、

GP+envAml2 和 DNA 细胞系(Miller、人类基因治疗, Vol. 1, pgs. 5-14(1990)描述的, 其全部内容本文一并参考)。载体可以用任何本领域已知的方法转导包装细胞。这些方法包括但不限于: 电穿孔、使用脂质体和 CaPO_4 沉淀。另外, 逆转录病毒质粒载体可以包埋在脂质体中, 或者偶联到脂类上, 然后引入宿主中。

5 生产细胞系产生感染性逆转录病毒载体颗粒, 该颗粒包含能够编码所述多肽的核酸序列。可以用这些逆转录病毒载体在体内或体外转导真核细胞。被转导的真核细胞将表达编码所述多肽的核酸序列。可以被转导的真核细胞包括但不限于: 胚胎干细胞、胚胎癌细胞、以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角质化细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

10 根据本发明的另一方面, 本发明涉及 Fwa267 基因在诊断或检测中的用途, 通过检测 Fwa267 核酸序列中的突变可以诊断出相关疾病或对疾病的易感性。

可以用多种技术在 DNA 水平上检测出携带 Fwa267 基因突变的个体。可以从患者的细胞, 如来自血液, 尿, 唾液, 活组织检查和尸体解剖材料的细胞。基因组 DNA 可以直接用于检测, 或者在分析前可以用 PCR 扩增(Saiki 等, 自然, 324 :163-166(1986))。RNA 或 cDNA 也可
15 用于相同目的。例如, 与本发明多核苷酸互补的 PCR 引物可于鉴别和分析突变。如通过与正常的基因型相比较, 根据扩增产物的大小改变来检测缺失及插入。可以经与可以用放射性标记的 RNA 或反义 DNA 与扩增后的核酸序列杂交, 以鉴别点突变。用 RNaseA 消化或通过解链温度的差异, 可以辨别完全配对序列和错配的双链。

通过 DNA 测序可以直接揭示对照基因和携带突变基因之间的序列差异。此外, 克隆的 DNA
20 片段可以作为探针检测特异的 DNA 区段。当与 PCR 结合使用时, 这种方法的灵敏性大大提高, 例如, 将测序引物和双链 PCR 产物、或者由改良的 PCR 法产生的单链模板分子一起使用。常规的自动测序法用放射性标记或荧光标记来确定核酸序列。

基于 DNA 序列差异的遗传试验可以通过检测在含有或不含变性剂的凝胶中, DNA 片段电泳迁移率的变化来实现。小的序列缺失和插入可以由高分辨率凝胶电泳显示。不同序列的 DNA
25 片段可以在变性甲酰胺梯度凝胶上进行区分, 根据其特定的熔点或部分解链温度, 不同的 DNA 片段将停滞在凝胶的不同位置(参见 Myers 等, 科学, 230 :1242(1985))。

用 RNase 和 S1 保护的核酸酶保护分析法或化学裂解法也可以检测特殊位置上的序列变化, (如 Cotton 等, PNAS, 美国, 85: 4397-4401(1985))。

因此, 可以用杂交、核糖核酸酶保护、化学裂解、直接 DNA 测序、或使用限制酶(如限制
30 性片段长度多态性(RFLP))和基因组 DNA 的 Southern 印迹法来检测 DNA 序列的差异。



除了更常规的凝胶电泳和 DNA 测序之外，突变也可以用原位分析法检测。

根据本发明的另一方面，本发明涉及一种通过检测不同组织中 Fwa267 多肽含量的改变而进行的诊断分析方法。这是基于与正常对照组织相比，某组织中该多肽的过量表达可以检测疾病或疾病易感性的存在。检测取自宿主的样品中本发明多肽之含量的分析方法是本领域
5 技术人员熟知的，方法包括放射免疫测定、竞争结合测定、Western 印迹分析、酶联免疫吸附 (ELISA) 测定和“夹心”测定，优选 ELISA 检测。ELISA 测定包括首先制备本发明多肽的特异性抗体，优选单克隆抗体。然后制备该单克隆抗体的报导抗体。将报导抗体与一种可检测试剂相结合，所说试剂如放射性试剂、荧光试剂或者辣根过氧化物酶。从宿主取样，并将其在与样品中蛋白质结合的固体支持物(如聚苯乙烯皿)中温育。通过和非特异性蛋白质(如
10 牛血清清蛋白)一起温育，将覆盖皿中任何自由的蛋白质结合位点。接下来，在单克隆抗体和结合到聚苯乙烯皿上的本发明任何多肽结合期间，将单克隆抗体在皿中温育。用缓冲液将所有未结合的单克隆抗体洗掉。此时，将和辣根过氧化物酶连接的受体抗体放入皿中，结果导致受体抗体和任何结合到本发明多肽上的单克隆抗体结合。然后将未结合的单克隆抗体洗掉。接着向皿中加入过氧化物酶底物，和标准曲线比较，在给定时间内产生的颜色的量即是
15 给定体积的患者样品中存在的蛋白质的量。

也可以用竞争测定法检测多肽含量。方法包括将 Fwa267 多肽的特异性抗体结合到固相支持物上，然后标记(如放射性标记)本发明的多肽，将取自宿主的样品通过固相支持物，然后通过检测标记量，确定样品竞争性结合抗体的量，从而确定样品中本发明多肽的含量。

本发明的序列对染色体的鉴别也极有价值。该序列特异性地靶向于人染色体的特定位置，并与之杂交。目前，仅有少数几种基于实际序列数据(重复多形性)的染色体标识试剂可用于标记染色的体位置。基于本发明 DNA 的染色体作图是将这些序列和疾病相关基因关联的首要的步骤。
20

简言之，通过由 cDNA 制备 PCR 引物(优选 15-25bp)可以进行序列的染色体定位。通过计算机分析基因的 3'非翻译区，可以快速选择引物。引物不应跨越基因组 DNA 的第一个外显子，否则将使扩增复杂化。然后，将引物用于 PCR 以筛选含有单个的人染色体的体细胞杂和
25 体。只有含有与该引物相应的基因的杂和体才会产生扩增片段。

体细胞杂合体的 PCR 作图是将特定 DNA 定位于特定染色体的快捷方法。根据本发明，用相同的寡核苷酸引物和来自特定染色体或大基因组克隆的一组片段，依照类似方法可以完成亚定位。可以用于染色体作图的其它作图方法包括原位杂交、用标记的、经流式分选的染色体进行预筛选以及用杂交进行预筛选，从而构建染色体特异性的 cDNA 文库。
30

cDNA 克隆与中期染色体涂片的荧光原位杂交(FISH)可以实现更精确的染色体位置。该技术可以采用 50 或 60 个碱基长短的 cDNA。详见 Verma 等人的综述, 人类染色体:基本技术手册, Pergamon 出版社, 纽约(1988)。

一旦完成了基因在染色体上的精确定位, 则可以将该基因在染色体上的物理位置与遗传图谱数据联系起来。这些数据可以在例如 V. McKusick, 人类孟德尔式遗传中找到(可通过互联网在 Johns Hopkins 大学的 Welch 医学文库中得到)。然后通过连锁分析(物理相邻基因的共遗传), 确定基因与已定位到染色体相同区域的疾病之间的关系。

随后需要确定患病个体和正常个体之间 cDNA 或者基因组序列的差异。如果在部分或全部患病个体中观察到突变, 但在正常个体中观察不到, 则所述突变可能是疾病的病因。

所说的多肽、其片段、其衍生物或类似物, 或表达上述物质的细胞可用作免疫原而产生抗体。抗体可以是多克隆或单克隆抗体。本发明也包括嵌合的、单链和人源化的抗体, 以及 Fab 片段或 Fab 表达文库的产物。本领域已知的多种方法均可用于产生这些抗体和片段。

通过向动物体(优选非人体)直接注射或者施用本发明的多肽可以获得相应的抗体。这样获得的抗体会与所述多肽结合。这样, 即使是编码多肽片段的序列也可以产生能够结合整个天然多肽的抗体。进而用这种抗体从表达该多肽的组织中分离多肽。

为了制备单克隆抗体, 可以采用任何一种通过连续的细胞系培养而生产抗体的技术。例如杂交瘤技术(Kohler 和 Milstein, 1975, 自然, 256 :495-497)、三体杂交瘤技术、人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor 等, 1983, 今日免疫学, 4:72)和 EBV-杂交瘤技术(Cole, 等, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。

可以将所述生产单链抗体的技术(美国专利 4, 946, 778)加以改进, 以生产抗本发明多肽(具免疫原性)的单链抗体。也可以用转基因小鼠表达抗本发明多肽(具免疫原性)的人源化抗体。

为了更清楚地理解本发明的实质, 现参照下列附图和实施例对其进行解释。附图和实施例是为了说明而不以任何方式限制本发明。

在以上所述的教导下, 本发明的许多改良和变化是可能的, 因此, 在附属权利要求的范围内, 可以以不同于以上特定描述的方式实施本发明。

图 1 显示了 fwa267 在正常组织的分布。

图 2 显示了 fwa267 在不同肿瘤细胞系中的分布。

图 3 显示了同型半胱氨酸的浓度对平滑肌细胞表达 Fwa267 的影响。

图 4 为 Fwa267 在成人及胎儿心脏中的表达。

图 5 为 Fwa267 在成人、胎儿及法乐氏四联症肥厚心肌细胞中的表达。

图 6 显示了 Fwa267 在正常和亚急性心衰动物主动脉，以及在慢性心衰动物心脏中的表达情况。

图 7 显示了 Fwa267 在正常心肌组织和心肌梗塞室壁瘤组织中的表达情况。

5 图 8 为 Fwa267 的蛋白电泳及 Western 印迹杂交结果。

实施例一、成人主动脉 cDNA 文库的构建

1.1 RNA 的提取

RNA gents® Total RNA Isolation System kit 购自美国 Promega 公司 (Cat No.Z5110)。操作如下：称取 0.3g 液氮中保存的成人主动脉组织，加入 10ml 变性液 (4M 异硫氰酸胍、25mM 柠檬酸三钠) 和 1ml 2M 乙酸钠 (pH4.0) 匀浆。加入等体积水饱和酚和 0.2 倍体积氯仿，剧烈振荡 15 秒，冰上放置 15 分钟。10,000rpm, 4℃ 离心 20 分钟。取上清，加等体积异丙醇，-20℃ 放置 2 小时，离心。再用变性液 5ml 悬浮沉淀，重复上述步骤。用 1ml 冰预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀，室温下蒸发痕量乙醇 5-10 分钟，用焦碳酸二乙脂 (diethyl pyrocarbonate, 以下简称 DEPC) 处理的去离子水溶解 RNA。

15 1.2 mRNA 的分离

成熟的 mRNA 的 3'端有一条由 20-250 个腺苷酸组成的 Poly(A)。根据该特征，可用亲和层析法分离 mRNA 和其它的 RNA。本实验使用的 oligo(dT)纤维素含有 12-18 个核苷酸 (T) 的多聚链。在多盐条件下，带有 oligo(A)尾巴的 mRNA 与 oligo(dT)结合并留在柱子上，而无 oligo(A)尾巴的 rRNA 与 tRNA 被洗掉，然后用低盐液洗脱挂在柱子上的 mRNA。

20 Quick prep® micro mRNA purification kit 购自瑞典 Pharmacia 公司。在 1.5ml 无 RNA 酶的离心管 1# 内加入 1ml oligo(dT)纤维素悬液；另取 1.5ml 离心管 2#，加入用上样缓冲液稀释的总 RNA 1ml；管 2# 和管 2# 室温离心 1 分钟，12000rpm；吸去管 1# 上清，将管 2# 的上清加入管 1#，轻摇 5-10 分钟；室温离心 10 秒，12000rpm；用 1ml 高盐缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.5M NaCl) 洗涤 5 次，离心；用 1ml 低盐缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1M NaCl) 洗涤 5 次，离心；用 0.3ml 低盐缓冲液悬浮 oligo(dT)沉淀并转移到微量离心柱，12000rpm，离心 5 秒；用 0.5ml 低盐缓冲液洗涤 3 次，离心；用 2×0.2ml 洗脱液收集 mRNA；用分光光度计测定光密度，计算 OD260/280 的比值；得到 300 μl mRNA，加入 7.5 μl 糖原，30 μl 2.5M 乙酸钾 (pH5.0)，750 μl 无水乙醇在 -70℃ 保存备用；使用前离心 5 分

钟, 75%乙醇洗涤, DEPC 处理的水溶解 mRNA。

1.3 cDNA 的合成

合成步骤参照 ZAP ExpressTMcDNA Synthesis Kit* and ZAP ExpressTMcDNA Gigapack® II Gold Cloning Kit* (美国 Stregene 公司, Catalog No.200403 和 200404)的说明书。

- 5 在 0.5ml 离心管中依次加入 5 μ l 10 \times 第一链缓冲液, 3 μ l 甲基化的 dNTP 混合物, 2 μ l Xho I 连接子 oligo(dT)18 引物 (1.4 μ g/ μ l), 32.5 μ l 用 DEPC 处理的去离子水, 1 μ l RNA 酶抑制剂 (40u/ μ l), 5 μ g mRNA, 置室温 10 分钟。再加入 1.5 μ l 莫洛尼氏鼠白血病病毒 (MMLV) 反转录酶 (50u/ μ l), 总反应体积 50 μ l。从中取出 5 μ l 转入另一离心管, 加入 0.5 μ l α -³²P 三磷酸脱氧腺苷 (dATP) (800ci/mmol) 以鉴定第一链合成质量。上述反应均在 37
- 10 $^{\circ}$ C 进行。

- 得到的 DNA/RNA 杂交分子在 DNA 聚合酶 I 的作用下, 以第一链为模板合成第二链。在冰浴中依次加入 45 μ l 第一链 cDNA, 20 μ l 10X 第二链缓冲液, 6 μ l dNTP 混合物, 114 μ l 去离子水, 2 μ l [α -³²P]dATP(800ci/mmol), 2 μ l RNA 酶 H(1.5u/ μ l), 1 μ l DNA 聚合酶 I(9.0 u/ μ l), 总体积 200 μ l。混匀, 16 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 小时。反应结束后, 用酚: 氯仿 (1: 1) 抽提,
- 15 乙醇沉淀。

1.4 cDNA 与载体的连接

- 从试剂盒中取出 9 μ l EcoRI 连接子 (序列分别为 5'-AATTCGGCACGAG-3'和 3'-GCCGTGCTC-5') 溶解沉淀。取 1 μ l 电泳, 鉴定第一和第二链合成质量。在剩余的 8 μ l 第二链 cDNA 中依次加入 1 μ l 10 X 连接酶缓冲液, 1 μ l 10mmol/L γ -三磷酸腺苷 (γ -ATP),
- 20 1 μ l T4 DNA 连接酶 (4u/ μ l), 8 $^{\circ}$ C 水浴 16 小时后, 70 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用限制酶 XhoI 消化 1.5 小时。琼脂糖凝胶(Sepharose)Cl-2B 过柱分离, 除去小于 400 碱基的核苷酸, 以提高全长 cDNA 在 cDNA 文库中的比例。

1.5 cDNA 克隆入 ZAP 噬菌体载体

- ZAP 噬菌体载体 (美国 Stratagene 公司) 上的多克隆位点允许插入长达 10Kb 的核酸片段, 进入宿主后质粒部分可从载体上切开, 形成质粒载体 Bluescript。该载体多克隆位点两侧有 T₇ 和 T₃ 噬菌体的启动子, 可以用于序列分析和探针合成。插入载体的 cDNA 片段可以表达具抗原性和生物活性的融合蛋白。实验详述如下:
- 25

在离心管内加入 100ng cDNA, 0.5 μ l 10X 连接酶缓冲液, 0.5 μ l 10mmol/L γ -ATP (pH7.5), 1ul ZAP 噬菌体载体(1ug/ul), 0.5ul T4 DNA 连接酶 (4u/ul), 加去离子水至总体积 5

μl。12℃连接 16 小时。

连接产物需包装外壳蛋白以产生有转染活性的重组噬菌体。快速从-70℃取出包装蛋白，溶解后，在 25ul 包装蛋白内加 1ul 连接反应物，混匀，22℃反应 2 小时，加入 500ul SM 缓冲液（0.1M NaCl，0.08M MgSO₄·7H₂O，0.05M Tris-HCl，0.01%明胶），20ul 氯仿。此混合物即为原始的 cDNA 文库。

1.6 计算阳性克隆的效价

取 5ul 原始的 cDNA 文库，用 45ul SM 缓冲液稀释。将 10ul 稀释后的溶液，加入 200ul 感受态 XL1-Blue MRF'宿主菌中（OD₆₀₀=0.5）。37℃水浴 20-30 分钟，加入 3ml 上层琼脂糖，混匀，铺于 NZY（0.09M NaCl，0.08M MgSO₄·7H₂O，0.5%酵母提取液，1% NZ 胺 A）平板上，倒置，37℃培养过夜，计算平板上的克隆数。

cDNA 文库的效价用噬菌斑成斑数（pfu/ml）表示。 $\text{pfu/ml} = (\text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数}) \times 1000 / \text{稀释液用量}(\text{ul})$ 。容量大于 1×10^6 个克隆的 cDNA 文库，能够保证其中含有每一个单拷贝的 mRNA。本发明成人主动脉 cDNA 文库的库容量为 2.4×10^6 个独立重组克隆。

1.7 cDNA 文库的扩增和保存

构建的 cDNA 文库可直接用于筛选，但不稳定。因为非野生型的噬菌体易失活，故需要扩增以方便多次筛选。取 5×10^4 个噬菌体转染 XL1-Blue MRF'宿主菌，铺板，37℃孵育 8-10 小时，然后在 150mm 平皿中加入 8ml SM 缓冲液，4℃培养过夜。离心，收集上清，即得到扩增后的 cDNA 文库。加入 0.3%氯仿，4℃保存。长期保存需加入 7%的二甲基亚砜（DMSO），-70℃冻存。

实施例二、新全长 cDNA 的克隆

2.1 随机克隆的多聚酶链反应（PCR）扩增

cDNA 文库铺盘，噬菌斑密度为 200-500 个克隆/培养皿（150mm），挑取清亮的单个噬菌斑转入含有 75ul SM 缓冲液和 5ul 氯仿的无菌离心管中，置于 4℃。用前混匀离心，取上清液 5ul，用 ZAP 噬菌体载体 3'端引物（5' CCAAGCTCGAAATTAACCCTCAC 3'）和 5'端引物（5' CAGTCAATTGTAATACGACTCACT 3'）进行 PCR 扩增，反应总体积 50ul。扩增参数为 94℃预变性 3 分钟；再 94℃45 秒，55℃30 秒，72℃3 分钟，共 30 个循环；72℃延伸 5-10 分钟。根据 1%琼脂糖凝胶中电泳带的亮度估算 PCR 产物的产量。

2.2 表达序列标签（EST）的序列测定

ABI377 自动测序仪（ABI PRISM™377DNA sequencer）和自动测序试剂盒（BigDye™

Terminator Ready Reaction Mix) 购自美国 PE 公司。依照推荐的使用条件, 用双脱氧链终止法测序。

用非放射性 CY5 荧光素 (CY5-fluorescein) 作标记物, 通用测序引物 T₃ (5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3') 和 T₇ (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG3') 进行测序, 每份样品中引物用量为 5pmol/ul。测序模板为 PCR 产物, 用量约 30-100 ng。PCR 扩增参数为 94℃ 3-5 分钟; 再 94℃ 30 秒, 50℃ 15 秒, 72℃ 1 分钟, 20 个循环; 94℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟, 15 个循环; 再 72℃ 延伸 5 分钟。DNA 产物在 8mol/L 尿素、6%聚丙烯酰胺凝胶板上电泳。电压 1500V, 功率 34W, 电泳 250-300 分钟 (ALF Express™ DNA sequence, 瑞典 Pharmacia 公司)。

10 2.3 EST 的生物信息学分析

用美国生物信息中心的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 软件, 将每个 cDNA 克隆的 EST 与 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库进行同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。根据 BLAST 的判断标准 (国内外大多数实验室的通用标准): 同源序列小于 100—200 个碱基, Score 值小于 100 的序列为新的 EST。本发明 Fwa267 的 EST 为新 EST。

15 2.4 EST 引物步移法测序

2.4.1 ZAP 噬菌体的体内环化

ZAP 噬菌体载体能将目的片段在宿主内直接从 λ 噬菌体载体转移到质粒, 环化为 PBK-CMV (带有 CMV 病毒早期启动子) 噬菌粒。环化步骤参照说明书 (ZAP Express cDNA Synthesis kit and ZAP Express cDNA Gigapack™ Gold Doning kit)。

20 用 3 ul 保存在 4℃ 携带新 EST 的噬菌体和 1ul 辅助噬菌体 (一类自身复制能力极低的噬菌体突变体, 可以为寄主细胞中质粒 DNA 的复制与包装提供蛋白酶和外壳蛋白质) 共转染 300ul 大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 株 (OD600=1.0)。获得单链 DNA 后, 再转染大肠杆菌 XL0LR 株 (试剂盒提供), 在试管内加 5ml LB 培养液, 2.5ul 卡那霉素, 37℃ 培养 12—16 小时。

2.4.2 质粒的提取和鉴定

25 用德国 QIAGEN 公司的 "QIAPrep Spin Miniprep kit" 提取质粒。2400rpm, 4℃ 离心 10 分钟, 收集过夜培养的细菌。弃上清, 加入 25ul 缓冲液 P1 (100ul/ml RNaseA, 50mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH8.0) 悬浮细菌, 移至灭菌的 1.5ml 离心管内。加 250ul 缓冲液 P2 (200mM NaOH, 1% SDS), 颠倒上清几次, 充分混匀。加 350ul 缓冲液 P3 (3.0M Kac, pH5.5), 立刻摇管 4-6 次。12,000rpm, 离心 10 分钟 (SORVALL® Mc12V 台式离心机)。收集上清, 30 将其移至底部套有收集管的微型纯化柱 (QIA prep Spin Miniprep) 内, 12000rpm, 离心 30-60

秒。加 0.75ul 缓冲液 TE (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH8.0), 离心 30-60 秒。去掉收集管, 在 QLAprep 微型纯化柱底部套一个灭菌的离心管, 加 50ul 缓冲液 EB (10mM Tris-HCl pH8.5) 或去离子水, 在柱床内保留 1 分钟后离心 1 分钟, 收集纯化的 DNA。

在离心管内加入 3ul 酶切缓冲液 (10×), 1ul NotI 内切酶 (15u/ul), 1ul ECoRI 内切酶 (15u/ul), 1ul BSA, 2ul DNA, 22ul 去离子水, 总体积 30ul。37℃温育 4-6 小时。酶切后鉴定质粒大小。

2.4.3 新的全长 cDNA 的测定

用美国 PE 公司的 ABI377 自动测序仪和测序试剂盒 BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix 测定 PBK-CMV 阳性克隆的序列。

反应液中有 BD 4ul, BOB 2ul (400mM Tris-HCl, pH9.0, 10mM MgCl₂), 引物 2 ul (5pmol/ul), DNA 模板 30-100 ng, 用 H₂O 补足至终体积 20ul。用步移法 (逐级引物法) 测定 cDNA 全长序列, 即下一轮的测序引物由上轮测序所得产物的末端碱基确定。用 oligo 14.0 软件设计 PCR 引物。

结果:

如 SEQ ID NO: 1 所示, Fwa267 cDNA 全长 3739 个碱基对。根据 kozak 规律, 推测其起始密码子为 107 至 109 核苷酸 (ATG)。编码序列为 107 至 1219 位核苷酸, 终止密码子为 1217 至 1219 位核苷酸。BLAST 分析表明该基因定位与 11 号染色体。

蛋白同源性分析表明: Fwa267 蛋白与分泌性生长因子 fallotein 的同源性为 46%。推测的 Fwa267 蛋白由 170 个氨基酸组成。其序列特征为: (A) 从 276 至 279 Aa (NYSV) 为 N-糖基化位点; (B) 从 268 至 271 Aa (KRYs) 为 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶位点; (C) 从 262 至 270 Aa (RLNDDAKRY) 为酪氨酸激酶位点; (D) 从 1 至 61Aa (MHRLIFVYTLICANFCSCRDTSATPQSASIKALRNANLRRDESNHLTDLYRRDETIQVKGn) 为 TonB 依赖的受体蛋白信号 1; (E) 从 100 至 105 Aa GLEEAE), 192 至 197 Aa (GVSYNS), 303 至 308 Aa (GGNCGC), 304 至 309 Aa (GNCGCG) 为豆蔻酰化位点; (F) 从 17 至 19 Aa (SCR), 29 至 31 Aa (SIK), 66 至 68 Aa (SPR), 80 至 82 Aa (TWR), 150 至 152 Aa (TFK), 243 至 245 Aa (TPR), 273 至 275 Aa (TPR), 243 至 245 Aa (TPR), 273 至 275 Aa (TPR), 320 至 322 Aa (SGK) 为蛋白激酶 C 位点。 (G) 从 17 至 20 Aa (SCRD), 168 至 171 Aa (SLLE), 181 至 184 Aa (TNWE), 199 至 202 Aa (SVTD), 219 至 222 Aa (TVED), 231 至 234 Aa (SWQE), 250 至 253 Aa (SYHD), 256 至 259 Aa (SKVD) 为酪蛋白激酶 II 位点。

实施例三、Fwa267 在正常组织的分布

3.1 实验材料

含 12 种组织的多组织膜 (MTN 膜) 购自美国 Clontech 公司, 用其检测 Fwa267 基因在正常组织中的分布。β-actin 是一种管家基因, 在多种组织中表达均一, 本实验中用作对照。

3.2 Northern 杂交

- 5 方法参照《现代分子生物学实验技术》(卢圣栋主编, 中国协和医科大学出版社, 第二版, 1999) 147-149, 202-205, 207-213 页。详述如下:

3.2.1 总 RNA 提取

- 称取 0.5g 组织于 50ml 离心管中, 加入 10ml GTC, 匀浆。加等体积水饱和酚及 0.2 体积氯仿, 剧烈振荡 15 秒, 冰上放置 20 分钟。4℃, 12, 000rpm 离心 25 分钟。取上清置于
10 另一离心管, 加等体积异丙醇, -20℃沉淀 1 小时。4℃ 12, 000rpm 离心 25 分钟, 弃上清。用 5ml GTC 重新溶解沉淀后, 重复其它操作。用 1ml 预冷的 75%乙醇洗涤, 晾干, 用 DEPC 处理过的水溶解。测 OD(光密度)260 及 OD280。

3.2.2 甲醛变性凝胶电泳

- 称取 0.6g 琼脂糖凝胶加入 52.2ml DEPC 处理过的水中, 加热溶解, 待胶冷到 65℃, 加
15 入 6.0ml 10×MOPS, 1.8ml 甲醛, 灌胶。取 4.5ul (40-60ug) 总 RNA, 加入 2.0ul 10×MOPS, 3.5ul 甲醛, 10ul 甲酰胺, 混匀, 65℃变性 15 分钟, 冰上冷却 2 分钟。加入 2.0ul 上样缓冲液, 混匀。50 伏预电泳 5 分钟, 上样。待染料全部进入胶后, 电压降为 40 伏, 每 10 分钟混合电泳缓冲液 1 次。

3.2.3 转膜

- 20 待溴酚兰泳动到凝胶底部, 停止电泳, 照相。用 DEPC 处理过的水洗胶数次, 用 50mM NaOH 处理 45 分钟, 用 20×SSC 处理 45 分钟。尼龙膜先用去离子水浸湿, 再用 20×SSC 处理 45 分钟。在胶托上铺一层滤纸, 用 20×SSC 浸湿, 除去气泡; 将胶倒置于胶托上, 其上面放一中间挖空的塑料薄片。小心将膜置于胶上, 除去气泡, 在膜上铺两张 20×SSC 浸湿的滤纸, 除去气泡。在滤纸上铺上 10cm 高的吸水纸, 压一 500 克的重物。转膜 16 小时, 中间换吸
25 水纸 2-3 次。小心取下膜, 照相, 用 6×SSC 泡膜 5 分钟。紫外交联, 80℃烤膜 1 小时, 4℃保存备用。

3.2.4 制备杂交模板

- 上游引物: 5' -CC GAATTC ATGCACCGGCTCATCTTTGTC-3', 斜体所示为保护碱基, 黑体所示为 EcoRI 酶切位点, 划线部分与 fwa267 核酸序列 107-127 位互补; 下游引物: 5'-GCCTCGAG
30 TCTTATCGAGGTGGTCTTGAGCTG -3', 斜体所示为保护碱基, 黑体所示为 XhoI 酶切位点, 划线

部分与 fwa267 核酸序列 1198-1221 位互补。

PCR 反应体系：10 倍缓冲液 5.0ul，脱氧核糖核酸 2.0ul，上游、下游引物各 3.0ul，Taq 酶 1.0ul，fwa267 测序质粒（模板）2.0ul，无菌水 34ul。PCR 参数：94℃ 预变性 3 分钟；94℃ 3 分钟，94℃ 20 秒，60℃ 30 秒，72℃ 80 秒，30 个循环。72℃ 7 分钟。用醋酸铵/乙醇（1：5）纯化 PCR 产物，溶于 50ul TE，用琼脂糖定量，将其稀释至 25ng/μl。

3.2.5 杂交

标记探针：在 0.5ml 离心管中加入 PCR 产物（在 98℃ 加热 4 分钟变性，冰上冷却 2 分钟）25ng，5× 标记缓冲液 10ul，dNTP（无 dCTP）2.0ul，BSA 2.0ul，Klenow 酶 1.0ul，[α-32P]dCTP 5.0ul，用无核酸酶的水补至总体积 50ul。室温反应 1-3 小时。

10 预杂交：将膜用 6×SSC 浸 5 分钟，贴于杂交管壁，除去气泡。加入 6ml 购于 Clontech 的杂交液，68℃ 1 小时。

杂交：倒掉杂交液，加入预热的杂交液 6ml，加入探针（探针需在 98℃ 加热 4 分钟变性，冰上冷却 2 分钟），68℃ 3 小时。

15 洗膜：先用 200ml 洗液 I（2×SSC，0.05% SDS）在室温洗膜四次，每次 10 分钟。再用 200ml 洗液 II（0.1×SSC，0.1% SDS）在 50℃ 洗 20 分钟，56℃ 洗 20 分钟。

压片：用滤纸吸去液体，用保鲜膜包好，贴于一张与 X 光片相同大小的滤纸上，压片。-70℃ 曝光适当时间，洗片。

结果：如图 1 所示：β-actin 在多种组织中的表达水平均一（图 1A）；fwa267 选择性地心脏中高水平表达，在胎盘及肾脏细胞中也有表达（图 1B）。

20 实施例四、fwa267 基因在肿瘤细胞株中的表达

4.1 实验材料

含 8 种肿瘤细胞系的 mRNA 的杂交膜购自美国 Clontech 公司，用其检测 Fwa267 基因在不同肿瘤细胞株中的分布。β-actin 作为本实验的对照。

4.2 Northern 杂交

25 参见实施例 3.2。

结果：如图 2 所示：β-actin 在若干种肿瘤组织中的表达水平均一（图 2A）；Fwa267 在被检测的几株肿瘤细胞系中几乎不表达，仅在早幼粒白血病 HL-60 细胞系、淋巴母细胞性白血病 MOL-4 细胞系、Burkitt's 淋巴瘤 Raji 细胞系低水平表达（图 2B）。

30 根据上述结果，推测 Fwa267 是一个增殖抑制因子。因为正常成人的心肌细胞是无增殖能力的终末分化细胞，而肿瘤细胞是增生失控的细胞。两类细胞增殖能力的差异可能是由于：

Fwa267 基因在正常成人心肌细胞中高度表达, 以维持其高度分化的状态; Fwa267 基因在肿瘤细胞中低水平表达, 导致其增生失控。

实例五、Fwa267 基因在不同心肌细胞中表达的差异

5.1 实验材料

5 来自胎儿、成人和法乐氏四联症患者的心肌细胞。

5.2 Northern 杂交

参见实施例 3.2。

结果: 如图 4 所示, Fwa267 基因在胎儿心脏中不表达,。由于正常成人的心肌细胞是没有增殖能力的终末分化细胞, 而胎儿的心肌细胞仍具有增殖分化的能力, 上述结果提示 Fwa267 与维持心肌的终末分化有关。

如图 5 所示, fwa267 基因在法乐氏四联症肥厚心肌和成人心脏中的表达水平相当, 但均高于在胎儿心脏的表达。法乐氏四联症肥厚心肌细胞坏死纤维化, 而 Fwa267 在其中的表达也提示 fwa267 与细胞增殖抑制有关。

实施例六、同型半胱氨酸对平滑肌细胞表达 Fwa267 的影响

15 同型半胱氨酸 (Homocysteine) 是近年证实的一个导致动脉硬化、脑中风、冠心病、心肌梗塞及周围血管病的独立危险因素。其能刺激细胞、特别是平滑肌细胞增生。本实验用不同浓度的同型半胱氨酸处理在体外培养的人主动脉平滑肌细胞, 观察细胞内 Fwa267 表达的变化。

6.1 复苏传代细胞

20 将来源于人主动脉的平滑肌原代细胞冻存管从液氮中取出后迅速放入 37℃ 水浴, 待其完全融化, 将细胞悬液接种于 25cm 培养瓶中, 瓶内预先加入 5ml 含 10% FBS 的 RPMI 或 DMEM。37℃, CO₂ 浓度为 5%, 孵育箱内培养过夜, 次日换液, 培养液仍为含 10% FBS 的 RPMI 或 DMEM。

6.2 传代培养

待细胞生长至基本融合 (覆盖率约为 80%) 时, 弃原培养液, 用 1×PBS (pH7.4) 冲洗细胞表面 2 次, 加入 0.125% 胰蛋白酶, 37℃ 消化 5-10 分钟。显微镜下观察, 待细胞回缩变圆并有部分漂浮时, 加入少许含 10% FBS 的培养液终止消化, 并用吸管反复吹打细胞表面, 收集消化液, 1000 RPM 离心 30 秒, 弃上清, 加入含 10% FBS 的培养液吹打, 混匀, 取出 0.1ml 用 1×PBS 稀释至 1.0ml, 计数, 按 100000 个细胞每 ml 将细胞悬液接种于培养瓶内, 瓶内预先加入 5ml 含 10% FBS 的 RPMI 或 DMEM。37℃, CO₂ 浓度为 5%, 孵育箱内培养。按此法将细胞传 3 代至所需数量。将基本融合 (覆盖率约为 80%) 的细胞, 弃原培养液, 换成含 0.4% FBS

的培养液继续培养 24-72 小时，使细胞生长处于静止期。

6.3 用同型半胱氨酸刺激人平滑肌细胞

配制 150mM 同型半胱氨酸，用 0.22um 滤膜过滤，再用 DMEM 稀释成 7.5mM、15mM、30mM 三种浓度。分别用 0.5mM、1.0mM、2.0mM 浓度的同型半胱氨酸刺激细胞 18h，在 1.0mM 组预
5 先加入 100uM 的大豆金雀异黄素孵育 6h，留取上清后，异硫氰丙酸（GTC）收获细胞。

6.4 Northern 杂交

取上述细胞 3 瓶，提取 mRNA。Northern 杂交参见实施例 3.2。

结果：

用同型半胱氨酸处理人平滑肌细胞 18 小时，可以抑制 Fwa267 基因的表达抑制，抑制
10 的程度随同型半胱氨酸浓度的升高而增加。

该结果提示：具有同型半胱氨酸的细胞增殖作用可能抑制 Fwa267 基因的表达，从而解除 Fwa267 对细胞增生的抑制。

实施例七、Fwa267 基因在正常、慢性心衰和亚急性心衰动物心脏中的表达

7.1 慢性心衰模型的建立

15 50只雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠（250—300克/只）购自本院动物房。标准块料由北京动物中心提供，饮水为自来水，水与饲料由动物随意摄取。

称重，根据体重以氯胺酮和安定腹腔内注射全麻大鼠。行气管内插管并接小型动物呼吸机。在心电监护仪的监护下左侧开胸，以6-10手术缝线结扎左冠状动脉前降支，关胸。以心电监护仪上有明显ST段升高为结扎成功的标志。待其苏醒后撤除呼吸机。术后饲养条件同
20 术前，50天后模型即建成。

7.2 亚急性心衰模型的建立

10只雄性Wistar大鼠（250克/只）购自解放军301医院，饲养条件同慢性心衰模型。

腹腔注射去甲肾上腺素30mg/日/只，连续注射4天，第5天模型即可以使用。

7.3 RNA-RNA 原位杂交

25 原位杂交技术基于碱基互补的原理，通过探针特异性地与细胞内特定的 mRNA 或 DNA 杂交，而显现出细胞内的基因及表达产物。该反应灵敏度极高，而且可检测出组织分化过程中仅瞬间表达的基因。杂交试剂盒 DIG RNA Labeling kit (Cat.No.1175025) 购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

7.3.1 探针制备

30 用特异引物 PCR，将 200-300 bp 的 Fwa267 核酸片段（222—504 位核苷酸）克隆入 T

Vector; 重组质粒扩增, 纯化; 用 T7 和 SP6 引物进行 PCR 扩增; 确定基因插入方向, 测序 (mRNA 和 AntimRNA)。加 T7RNA 聚合酶合成反义探针, SP6 RNA 聚合酶正义探针 (检查杂交系统的可靠性)。

7.3.2 探针标记

- 5 先用酚/氯仿抽提被转录的线形 DNA, 再用酒精沉淀。将无 RNA 酶的离心管置冰上, 向管内加入 1 μ l 纯化的线性 DNA, 2 μ l NTP 标记混合液, 2 μ l 10 \times 转录缓冲液, 1 μ l RNA 酶抑制剂, 2 μ l (40u) SP6 或 T7 RNA 聚合酶, 共 20 μ l。混匀, 稍加离心, 加入 20 u 不含 RNA 的 DNA 酶 I, 37 $^{\circ}$ C 15 分钟。加入 2 μ l 0.2 mol/L EDTA (pH8.0) 以终止聚合反应。

- 10 在上述物质中加入 2.5 μ l 4mol/L LiCl、和 75 μ l 酒精 (-20 $^{\circ}$ C) 的充分混匀, -70 $^{\circ}$ C 放置至少 30 分钟 (或 -20 $^{\circ}$ C 放置至少 2 小时)。12,000rpm 离心, 70% 冷乙醇洗涤, 干燥后。加 100 μ l DEPC 水和 20u RNase, 37 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟后分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

7.3.3 玻片处理及标本制备

彻底清洗玻片, 高压消毒 30 分钟, 将玻片在含有多聚赖氨酸 (0.01%) 的溶液中浸蘸几下, 干燥, 4 $^{\circ}$ C 备用。

- 15 新鲜标本 (取自鼠心脏、主动脉) 0.4cm \times 0.4cm, 用 1 \times PBS 冲洗两次, 置于冰冻切片机固定头上。8-10 μ m 切片, 置有 1 mg/ml 多聚赖氨酸的载玻片上晾干, 4% 多聚甲醛固定 15-20 分钟。1 \times PBS 冲洗 2 次, 每次 5 分钟。

7.3.4 杂交前处理

- 20 用 0.2N HCl 浸泡 25 分钟。0.3% 的 Triton X-100 浸泡 5 分钟。用 1 \times PBS 洗两次, 每次 5 分钟。用 4% 的多聚甲醛后固定 6 分钟。用 1 \times PBS 洗两次, 每次 5 分钟。在 1000 毫升 0.1mol/L 三乙醇胺 (pH8.0) 溶液中加入 5ml 乙酸酐, 待其完全溶解将切片置于 10 分钟。以上反应均在室温下进行。

7.3.5 杂交反应

- 25 杂交液含有 5ml 去离子甲酰胺, 2.5ml 20 \times SSC, 500 μ l 100 \times Denhardt's 液 (10g 蔗糖, 10g 聚乙烯吡咯烷酮, 10g 牛血清白蛋白, 500ml 消毒双蒸水), 500 μ l 10%SDS, 100 μ l 10mg/ml 变性的鲑鱼精子 DNA, 400 ul DEPC 水。

将切片从乙酰化溶液中捞出, 用滤纸吸干标本四周液体, 用在标本周围画一小圈。加预杂交液 30ul 在小圈内, 湿盒内 42 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。甩去预杂交液, 用 25ul 杂交液覆盖 Parafilm 膜, 湿盒内 42 $^{\circ}$ C 温育 16 小时, 封闭湿盒。

- 30 7.3.6 杂交后处理

将玻片从温盒取出，去掉 Parafilm 膜。2×SSC 室温冲洗三次，每次 10 分钟。1×SSC 室温冲洗三次，每次 10 分钟。0.1×SSC 50℃冲洗两次，每次 15 分钟。

若本底过高，将玻片置于含 20 μg/ml RNA 酶的溶液(0.5mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0)中，37℃消化 30 分钟。再用不含 RNA 酶的上述溶液于 37℃冲洗 30 分钟，洗膜。

5 7.3.7 显色反应

玻片浸泡于清洗液(1M 顺丁烯二酸, 0.15M NaCl; 0.3% (V/V) Tween-20)。在 100ml 封闭液(试剂盒中的阻断剂按 10% (W/V) 加入顺丁烯二酸缓冲液(0.1mol/L 顺丁烯二酸, 0.15mol/L NaCl)，使用时 1:10 稀释)中温育 30 分钟。加 20ml 抗体溶液，温育 30 分钟。用 100ml 清洗液洗两次，每次 15 分钟。加 20ml 检测液(0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5)平衡 2-5 分钟。在 10ml 新配制的显色液(10 ml 检测液中加 200ul NBT/BCIP)中温育，避光，勿摇动。用消毒双蒸水或 TE 冲洗。

结果：如图 6 所示，Fwa267 在正常主动脉的表达较低；亚急性心衰、慢性心衰动物主动脉 Fwa267 的表达明显增高。

实例八、免疫组织化学

15 8.1 实验材料

人急性心肌梗塞并发症室壁瘤组织。

8.2 免疫组织化学分析

用重组正确的原核表达质粒转染 E. coli B1 21 感受态细胞，超声破碎细胞，经 10%变性聚丙烯酰胺电泳，确定目的基因条带，选用超声和电洗脱法，从包涵体中获取融合蛋白经 Western 印迹鉴定目的蛋白后，免疫动物所获得的血清即为本实验的一抗。

石蜡切片 5 微米，贴附于包被有多聚赖氨酸的 APES 玻片上，75℃烤片 2 小时。二甲苯脱蜡后经梯度酒精后切片入水。3% H₂O₂ 内 10 分钟。蒸馏水洗三遍，放入 EDTA 抗原修复液内(pH8.0)，置微波炉中烘烤(96℃—98℃)10 分钟。室温冷却 20—30 分钟，蒸馏水洗三遍。入 1×PBS 缓冲液 5 分钟。10%正常兔血清 20 分钟。加适当稀释的一抗，4℃内孵育过夜。1×PBS 洗三次后，加生物素标记的羊抗兔二抗，室温 10 分钟。1×PBS 洗三次，加酶联链霉亲和素三抗，室温 10 分钟。1×PBS 洗三次，DAB 显色。蒸馏水三次，苏木素浅染胞核、脱水、封片。

结果：如图 7 所示，正常心肌细胞低水平表达 Fwa267，而室壁瘤组织则高表达 Fwa267。

实施例九、Fwa267 基因的体外重组及蛋白表达

30 9.1 构建重组载体

9.1.1 酶切

载体为 pGEX-5X-1。取 2.0ul pGEX-5x-1 载体, 5.0ul 缓冲液, 2.0ul XhoI, 2.0ul EcoRI, 39ul 无菌水, 37℃酶切 16 小时。纯化酶切产物。

PCR 引物(上游引物 5'-CCGAATTC ATGCACCGGCTCATCTTTGTC-3', 下游引物 5'-GCCTCGAG TCTTATCGAGGTGGTCTTGAGCTG -3') 同 Northern 杂交, PCR 反应同实施例 3.2.4。取 10 ul PCR 纯化产物, 5.0ul 缓冲液, 2.0ul XhoI, 2.0ul EcoRI, 31ul 无菌水, 37℃酶切 16 小时。纯化酶切产物。

9.1.2 连接

2.0ul pGEX-5x-1 酶切产物, 2.0ul PCR 酶切产物, 2.0ul 10X 缓冲液, 1.0ul T4 连接酶, 13ul 无菌水, 16℃连接 6 小时。

9.1.3 转化

取上述连接产物 1.0ul, 加入 200ul E. coli DH5α 感受态细胞。混匀, 置于冰上 30 分钟。42℃60 秒, 冰上 2 分钟。加入 800ul SOC 培养基 37℃摇菌 (小于 225RPM) 45 分钟。取 100ul 涂于含 Amp(氨卞青霉素)抗性的 LB 平板上。37℃30 分钟以充分吸收液体。37℃培养 16 小时。挑单克隆置于 5ml 含 50ugAmp 的 LB 培养基中 37℃摇 16 小时。

9.1.4 质粒提取

菌液 2000RPM 离心 10 分钟, 弃上清。沉淀中加预冷的溶液 I (25mM Tris-HCl, pH8.0, 2.0mM EDTA, 50mM glucose) 140ul, 悬浮细菌。用 280ul 新配制的溶液 II (0.2M NaOH, 1% SDS) 裂解细菌。再加入 450ul 预冷的溶液 III (4.0M Potassium acetate), 混匀。离心 4000RPM 10 分钟, 12000RPM 10 分钟。取上清, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 同上离心。用 100ul TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) 和 20ug/ml 的 RNA 酶溶解沉淀, 37℃30 分钟。加 600ul 醋酸铵/乙醇 (1: 5), -70℃放置 30 分钟。离心后用 75%乙醇洗涤。用 TE 100ul 溶解提取的质粒, 测 OD260/280 定量。

9.1.5 挑选阳性克隆

用 PCR 的方法鉴定阳性克隆。

9.2 在原核系统中的表达

用重组正确的质粒转化 E. coli BL21 感受态细胞。转化, 培养细菌。按 1: 100 比例取上面菌液加入 50ml2X YTA 培养基中。37℃摇菌 4-6 小时使其 OD600 为 0.6-0.8。加入 IPTG, 使其浓度为 0.4mM, 继续摇 4 小时。7700g 离心 10 分钟, 弃上清。用冰上预冷的 1×PBS(50ul/ml 菌液) 悬浮细菌。超声破碎细胞。10000g 离心 10 分钟。在上清及沉淀中加入上样缓冲液,

95℃-100℃煮 5 分钟变性。在 10%的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳，待溴酚兰到最底端。染色，脱色，确定目的条带。

结果：如图 8A 所示，用上海丽珠东风生物技术有限公司的低分子量 marker 作参照，Fwa267 蛋白的分子量约为 40KD。

5 9.3 包涵体分离

收集菌液，按 5 菌液:1 裂解液（体积比）的比例加入裂解缓冲液（1M PMSF，1mg/ml 溶菌酶溶于 PBS），冰浴 20 分钟。加入 Triton-X 100 终浓度为 1%，冰浴 10 分钟。20HZ 超声 30 秒，4℃15,000RPM 离心 25 分钟，留少量上清备用。在沉淀中加入 5 倍体积的包涵体洗液，重悬包涵体，20HZ 超声 30 秒，4℃15,000 RPM 离心 25 分钟。重复该过程 4-5 次。3,000RPM 离心 10 分钟，弃上清。15,000RPM 离心 15 分钟，重悬沉淀于变性缓冲液 I（2mM DTT，2mM EDTA pH8.0）（10ml/g）中，超声 30 秒。重悬沉淀于变性缓冲液 II（40mM NaOH（（10ml/g）中，超声 1 分钟。重悬沉淀于 1/4 体积的变性缓冲液 III（40% 甘油，50mM Tris-Cl，pH8.0，1ul PMSF）中，冰浴 5 分钟。4℃15,000RPM 离心 1 小时，收集上清，-20℃保存备用。

9.4 Western 印迹杂交

15 电泳分离粗产物。切下目的条带，装入透析袋，50 伏电泳 12-16 小时，100 伏 2 小时，倒转电极一分钟。弃胶，PEG 浓缩，1×PBS 透析 16 小时，4 小时换液一次。

取纯化的蛋白 20ul 加 5ul 5×上样缓冲液在 12%的 SDS-PAGE 胶上电泳，100V 伏 2 小时。取下胶，将胶泡在电转液中 30 分钟。剪六张与膜同样大小的滤纸，一张硝酸纤维素膜。将胶置于负极，硝酸纤维素膜置于正极，两侧各加三张滤纸，置于半干式转膜仪中，11mA 转膜一小时（0.65mA/cm²）。取下膜，将膜置于 10ml 封闭液中室温封闭一小时。倒出封闭液，加 20ml TBST 洗膜 5 分钟，再重复一次。按 1: 20,000 的比例稀释一抗，加 1ul 一抗加 20ml 封闭液，室温一小时。倒出封闭液，洗膜。按 1: 1,000 稀释二抗，加 10ul 兔抗羊 IgG/AP+10ml 封闭液，室温一小时。倒出封闭液，洗膜。加 20ml PBS 洗膜 5 分钟，再重复一次。加 20ml 碱性磷酸酶缓冲液洗膜 5 分钟。33ul NBT 加 5ml 碱性磷酸酶缓冲液加 16.5ul BCIP，室温显色 5 分钟。终止显色。加 20ml 高压水洗 5 分钟。

结果：如图 8B 所示，在 40KD 左右有 Fwa267 蛋白的杂交带。

本发明并不限于上述具体的实施例，实施例仅用于说明本发明的某些方面。功能上等同的方法和物质已包括在本发明的范围内。事实上，根据本文的描述和附图，基于本发明的各种改变对本领域的技术人员而言是显而易见的。这样的改变已包括在本发明权利要求的范围内。

序 列 表

5 一般信息

(i) 申请人: 中国医学科学院心血管病研究所

10

(ii) 发明名称: 肌细胞增殖抑制因子 Fwa267

(iii) 序列数: 2

(iv) 通讯地址:

15

(A) 联系人: 惠汝太

(B) 街道: 西城区北礼士路 167 号

(C) 城市: 北京

(D) 国家: 中国

(E) 邮编: 100037

20

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 3.5 英寸软盘

(B) 计算机: 奔腾 166MMX

(C) 操作系统: WINDOWS 95

(D) 软件: WORD 97

25

30

(1) SEQ ID NO:1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 序列类型: 核苷酸

(B) 长度: 3739 个碱基对

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

10 (iii) 来源: 成人主动脉 cDNA 文库

(iv) 在基因组中的定位: 11 号染色体

(v) 序列描述:

	10	20	30	40	50	60
15						
1	GCAGGGCGAG	CGCAGGCGGC	GAGAGCGCAG	GGCGGCGCGG	CGTCGGTCCC	GGGAGCAGAA
61	CCCGGCTTTT	TCTTGAGCG	ACGCTGTCTC	TAGTCGCTGA	TCCCAAATGC	ACCGGCTCAT
121	CTTTGTCTAC	ACTCTAATCT	GCGCAAACCTT	TTGCAGCTGT	CGGGACACTT	CTGCAACCCC
181	GCAGAGCGCA	TCCATCAAAG	CTTTGCGCAA	CGCCAACCTC	AGGCGAGATG	AGAGCAATCA
20	241	OCTCACAGAC	TTGTACCGAA	GAGATGAGAC	CATCCAGGTG	AAAGGAAACG
301	GAGTCCTAGA	TTCCCGAACA	GCTACCCCAG	GAACCTGCTC	CTGACATGGC	GGCTTCACTC
361	TCAGGAGAAT	ACACGGATAC	AGCTAGTGTT	TGACAATCAG	TTTGATTAG	AGGAAGCAGA
421	AAATGATATC	TGTAGGTATG	ATTTTGTGGA	AGTTGAAGAT	ATATCCGAAA	CCAGTACCAT
25	481	TATTAGAGGA	CGATGGTGTG	GACACAAGGA	AGTTCCTCCA	AGGATAAAAT
541	CCAAATTAAA	ATCACATTCA	AGTCCGATGA	CTACTTTGTG	GCTAAACCTG	GATTCAAGAT
601	TTATTATTCT	TTGCTGGAAG	ATTTCCAACC	CGCAGCAGCT	TCAGAGACCA	ACTGGGAATC
661	TGTCACAAGC	TCTATTTTCA	GGGTATCCTA	TAACCTCTCA	TCAGTAACGG	ATCCCACTCT
721	GATTGCGGAT	GCTCTGGACA	AAAAAATTGC	AGAATTTGAT	ACAGTGGAAG	ATCTGCTCAA
30	781	GTAATTCAAT	CCAGAGTCAT	GGCAAGAAGA	TCTTGAGAAT	ATGTATCTGG
841	GTATCGAGGC	AGGTCATACC	ATGACCGGAA	GTCAAAAGTT	GACCTGGATA	GGCTCAATGA
901	TGATGCCAAG	CGTTACAGTT	GCACTCCCAG	GAATTACTCG	GTCAATATAA	GAGAAGAGCT
961	GAAGTTGGCC	AATGTGGTCT	TCTTTCCACG	TTGCCTCCTC	GTGCAGCGCT	GTGGAGGAAA
1021	TTGTGGCTGT	GGAAGTGTCA	ACTGGAGGTC	CTGCACATGC	AATTCAGGGA	AAACCGTGAA
35	1081	AAAGTATCAT	GAGGTATTAC	AGTTTGAGCC	TGGCCACATC	AAGAGGAGGG
1141	GACCATGGCT	CTAGTTGACA	TCCAGTTGGA	TCACCATGAA	CGATGTGATT	GTATCTGCAG
1201	CTCAAGACCA	CCTCGATAAG	AGAATGTGCA	CATCCTTACA	TTAAGCCTGA	AAGAACCCTT
1261	AGTTTAAGGA	GGGTGAGATA	AGAGACCCCT	TTCCTACCAG	CAACCAAACCT	TACTACTAGC

1321 CTGCAATGCA ATGAACACAA GTGGTTGCTG AGTCTCAGCC TTGCTTTGTT AATGCCATGG
1381 CAAGTAGAAA GGTATATCAT CAACTTCTAT ACCTAAGAAT ATAGGATTGC ATTTAATAAT
1441 AGTGTGTTGAG GTTATATATG CACAAACACA CACAGAAATA TATTCATGTC TATGTGTATA
1501 TAGATCAAAT GTTTTTTTTG GTATATATAA CCAGGTACAC CAGAGCTTAC ATATGTTTGA
5 1561 GTTAGACTCT TAAAATCCTT TGCCAAAATA AGGGATGGTC AAATATATGA AACATGTCTT
1621 TAGAAAATTT AGGAGATAAA TTTATTTTAA AATTTTGAAA CACAAAACAA TTTTGAATCT
1681 TGCTCTCTTA AAGAAAGCAT CTTGTATATT AAAATCAAA AGATGAGGCT TTCTTACATA
1741 TACATCTTAG TTGATTATTA AAAAAGGAAA AATATGGTTT CCAGAGAAAA GGCCAATACC
1801 TAAGCATTTT TTCCATGAGA AGCACTGCAT ACTTACCTAT GTGGACTATA ATAACCTGTC
10 1861 TCCAAAACCA TGCCATAATA ATATAAGTGC TTTAGAAATT AAATCATTGT GTTTTTTATG
1921 CATTTTGCTG AGGCATGCTT ATTCAATTAA CACCTATCTC AAAAECTTAC TTAGAAGGTT
1981 TTTTATTATA GTCCTACAAA AGACAATGTA TAAGCTGTAA CAGAATTTTG AATTGTTTTT
2041 CTTTGCAAAA CCCCTCCACA AAAGCAAATC CTTTCAAGAA TGGCATGGGC ATTCTGTATG
2101 AACCTTTCCA GATGGTGTTT AGTGAAAGAT GTGGGTAGTT GAGAACTTAA AAAGTGAACA
15 2161 TTGAAACATC GACGTAAGT GAAATTAGGT GGGATATTTG ATAGGATCCA TATCTAATAA
2221 TGGATTGCAA CTCTCCAAAC TACACCAATT AATTTAATGT ATCTTGCTTT TGTGTTCCCG
2281 TCTTTTTGAA ATATAGACAT GGATTTATAA TGGCATTTTA TATTTGGCAG GCCATCATAG
2341 ATTATTTACA ACCTAAAAGC TTTTGTGTAT CAAAAAATC ACATTTTATT AATGTAAATT
2401 TCTAATCGTA TACTTGCTCA CTGTTCTGAT TTCTGTGTTT TGAACCAAGT AAAATCAGTC
20 2461 CTAGAGGCTA TGGTTCTTAA TCTATGGAGC TTGCTTTAAG AAGCCAGTTG TCAATTGTGG
2521 TAACACAAGT TTGGCCCTGC TGTCTACTG TTTAATAGAA AACTGTTTTA CATTGGTTAA
2581 TGGTATTTAG AGTAATTTTT TCTCTCTGCC TCCTTTGTGT CTGTTTTAAA GGAGACTAAC
2641 TCCAGGAGTA GGAAATGATT CATCATCCTC CAAAGCAAGA GGCTTAAGAG AGAAACACCG
2701 AAATTCAGAT AGCTCAGGGA CTGCTAACAG AGAACTACAT TTTTCTTAT TGCCTTGAAA
25 2761 GTTAAAAGGA AAGCAGATTT CTTCACTGAC TTTGTGGTCC TACTAACTAC AACCAGTTTG
2821 GGTGACAGG CTGGTAAAGT CCCAGTGTTA GATGAGTGAC CTAAATATAC TTAGATTTCT
2881 AAGTATGGTG CTCTCAGGTC CAAGTTCAAC TATTCTTAAG CAGTGCAATT CTTCCAGTT
2941 ATTTGAGATG AAAGATCTCT GCTTATTGAA GATGTACCTT CTAAAACCTT CCTAAAAGTG
3001 TCTGATGTTT TTAACAAGA GGGGAGTGGT AAAATTAAAT ACTCTATTGT TCAATTCTCT
30 3061 AAAATCCCAG AACACAATCA GAAATAGCTC AGGCAGACAC TAATAATTAA GAACGCTCTT
3121 CCTCTTCATA ACTGCTTTGC AAGTTTCCTG TGAAAACATC AGTTTCCTGT ACCAAAGTCA
3181 AAATGAACGT TACATCACTC TAACCTGAAC AGCTCACAAT GTAGCTGTAA ATATAAAAAA
3241 TGAGAGTGTT CTACCCAGTT TTCAATAAAC CTTCCAGGCT GCAATAACCA GCAAGGTTTT
3301 CAGTTAAAGC CCTATCTGCA CTTTTATTT ATTAGCTGAA ATGTAAGCAG GCATATTCAC
35 3361 TCACTTTTCT TTGCCTTTCC TGAGAGTTTT ATTA AAAACTT CTCCCTGGT TACCTGTTAT
3421 CTTTTGCACT TCTAACATGT AGCCAATAAA TCTATTTGAT AGCCATCAAA GGAATAAAAA
3481 GCTGGCCGTA CAAATTACAT TTCAAAAACAA ACCCTAATAA ATCCACATTT CCGCATGGCT
3541 CATTCACCTG GAATAATGCC TTTTATTGAA TATGTTCTTA TAGGGCAAAA CACTTTCATA
3601 AGTAGAGTTT TTTATGTTTT TTGTCATATC GGTAACATGC AGCTTTTCC TCTCATAGCA
40 3661 TTTTCTATAG CGAATGTAAT ATGCCTCTTA TCTTCATGAA AAATAAATAT TGCTTTTGAA
3721 CAAAAA AAAA

(2) SEQ ID NO:2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 序列类型: 氨基酸

(B) 长度: 370 个氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

10 (iii) 来源: 成人主动脉 cDNA 文库

(iv) 推测蛋白的序列特征:

(A) 从 276 至 279 Aa (NYSV) 为 N-糖基化位点

(B) 从 268 至 271 Aa (KRYV) 为 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶位点

15 (C) 从 262 至 270 Aa (RLNDDAKRY) 为 酪氨酸激酶位点

(D) 从 1 至 61 Aa (MHRLIFVYTLICANFCSCRDTSATPQSASIKALRNANLRRDESNHLTDL
YRRDETIQVKGN) 为 TonB 依赖的受体蛋白信号 1

(E) 从 100 至 105 Aa (GLEEAE), 192 至 197 Aa (GVSYNS), 303 至 308 Aa (GGNCGC),
304 至 309 Aa (GNCGCG) 为 豆蔻酰化位点

20 (F) 从 17 至 19 Aa (SCR), 从 29 至 31 Aa (SIK), 从 66 至 68 Aa (SPR), 从
80 至 82 Aa (TWR), 从 150 至 152 Aa (TFK), 从 243 至 245 Aa (TPR), 从 273 至 275
Aa (TPR), 从 243 至 245 Aa (TPR), 从 273 至 275 Aa (TPR), 从 320 至 322 Aa (SGK)
为 蛋白激酶 C 位点

25 (G) 从 17 至 20 Aa (SCRD), 从 168 至 171 Aa (SLLE), 从 181 至 184 Aa (TNWE),
从 199 至 202 Aa (SVTD), 从 219 至 222 Aa (TVED), 从 231 至 234 Aa (SWQE), 从
250 至 253 Aa (SYHD), 从 256 至 259 Aa (SKVD) 为 酪蛋白激酶 II 位点

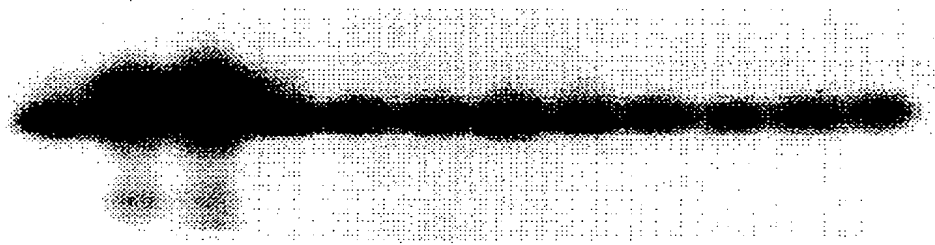
(v) 序列描述:

		5		10		15										
	1	Met	His	Arg	Leu	Ile	Phe	Val	Tyr	Thr	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Phe
5	16	Cys	Ser	Cys	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Thr	Pro	Gln	Ser	Ala	Ser	Ile
	31	Lys	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Asn	Leu	Arg	Arg	Asp	Glu	Ser	Asn	His
	46	Leu	Thr	Asp	Leu	Tyr	Arg	Arg	Asp	Glu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Gly
	51	Asn	Gly	Tyr	Val	Gln	Ser	Pro	Arg	Phe	Pro	Asn	Ser	Tyr	Pro	Arg
	76	Asn	Leu	Leu	Leu	Thr	Trp	Arg	Leu	His	Ser	Gln	Glu	Asn	Thr	Arg
10	91	Ile	Gln	Leu	Val	Phe	Asp	Asn	Gln	Phe	Gly	Leu	Glu	Glu	Ala	Glu
	106	Asn	Asp	Ile	Cys	Arg	Tyr	Asp	Phe	Val	Glu	Val	Glu	Asp	Ile	Ser
	121	Glu	Thr	Ser	Thr	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Trp	Cys	Gly	His	Lys	Glu
	136	Val	Pro	Pro	Arg	Ile	Lys	Ser	Arg	Thr	Asn	Gln	Ile	Lys	Ile	Thr
	151	Phe	Lys	Ser	Asp	Asp	Tyr	Phe	Val	Ala	Lys	Pro	Gly	Phe	Lys	Ile
15	166	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Gln	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu
	181	Thr	Asn	Trp	Glu	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr
	196	Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Thr	Asp	Pro	Thr	Leu	Ile	Ala	Asp	Ala	Leu
	211	Asp	Lys	Lys	Ile	Ala	Glu	Phe	Asp	Thr	Val	Glu	Asp	Leu	Leu	Lys
	226	Tyr	Phe	Asn	Pro	Glu	Ser	Trp	Gln	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Met	Tyr
20	241	Leu	Asp	Thr	Pro	Arg	Tyr	Arg	Gly	Arg	Ser	Tyr	His	Asp	Arg	Lys
	256	Ser	Lys	Val	Asp	Leu	Asp	Arg	Leu	Asn	Asp	Asp	Ala	Lys	Arg	Tyr
	271	Ser	Cys	Thr	Pro	Arg	Asn	Tyr	Ser	Val	Asn	Ile	Arg	Glu	Glu	Leu
	286	Lys	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Phe	Phe	Pro	Arg	Cys	Leu	Leu	Val	Gln
	301	Arg	Cys	Gly	Gly	Asn	Cys	Gly	Cys	Gly	Thr	Val	Asn	Trp	Arg	Ser
25	316	Cys	Thr	Cys	Asn	Ser	Gly	Lys	Thr	Val	Lys	Lys	Tyr	His	Glu	Val
	331	Leu	Gln	Phe	Glu	Pro	Gly	His	Ile	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Ala	Lys
	346	Thr	Met	Ala	Leu	Val	Asp	Ile	Gln	Leu	Asp	His	His	Glu	Arg	Cys
	361	Asp	Cys	Ile	Cys	Ser	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg					

01.02.23

说明书附图

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



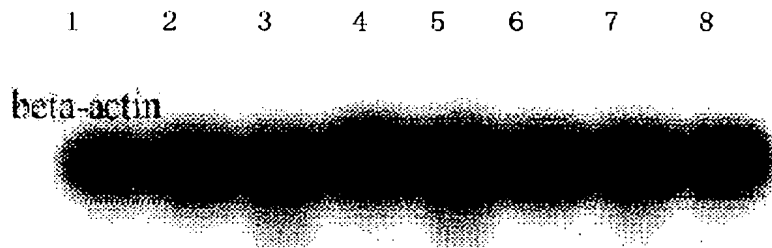
A、 β -actin 与 MTN 膜的杂交结果

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

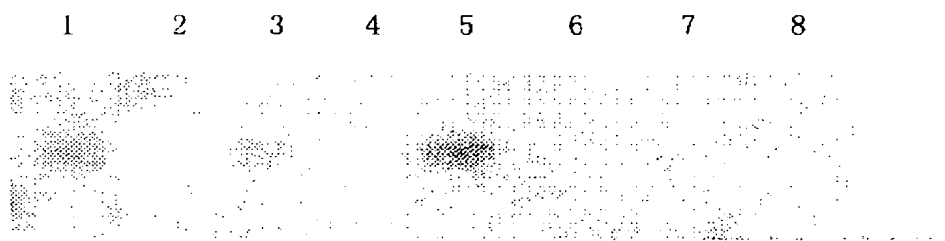
B、fwa267 与 MTN 膜的杂交结果

1 为脑, 2 为心脏, 3 为骨骼肌, 4 为结肠 (不含粘膜), 5 为胸腺,
6 为脾, 7 为肾脏, 8 为肝脏, 9 为小肠, 10 为胎盘, 11 为肺,
12 为外周血白细胞

图 1 fwa267 在不同组织中的分布



A、 β -actin 与肿瘤细胞系膜的杂交结果

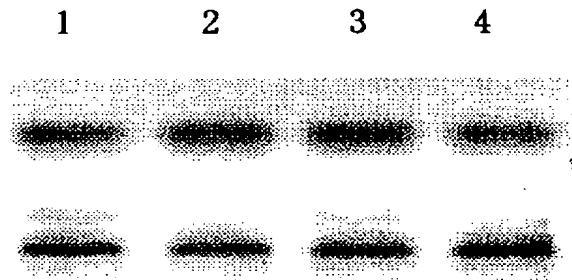


B、 β -actin 与肿瘤细胞系膜的杂交结果

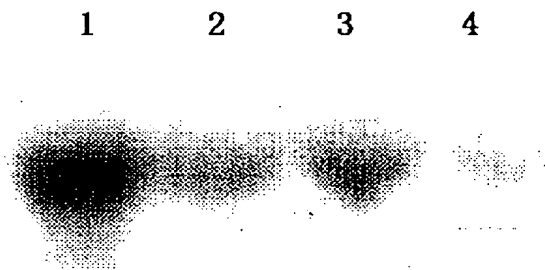
- | | |
|----------------------------|------------------------|
| 1 为早幼粒白血病 HL-60 细胞系 | 2 为宫颈癌细胞系 S3 株 |
| 3 为慢性粒细胞白血病 K-562 细胞系 | 4 为淋巴母细胞性白血病 MOL-4 细胞系 |
| 5 为 Burkitt's 淋巴瘤 Raji 细胞系 | 6 为结肠腺癌 SW480 细胞系 |
| 7 为肺癌 A549 细胞系 | 8 为黑色素瘤 G-361 细胞系 |

图 2 fwa267 在不同肿瘤细胞系中的分布

01.02.21 31



A、上样量



B、同型半胱氨酸刺激不同时间后 Fwa267 的表达

- 1 为对照 (即未刺激)
- 2 为 0.5mM Homocysteine 刺激 18 小时
- 3 为 1.0mM Homocysteine 刺激 18 小时
- 4 为 2.0mM Homocysteine 刺激 18 小时

图 3 同型半胱氨酸的浓度对平滑肌细胞表达 Fwa267 的影响

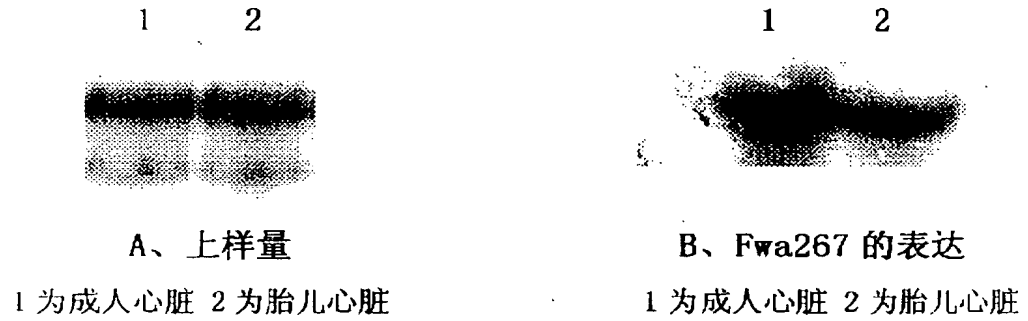


图 4 Fwa267 在成人及胎儿心脏中的表达

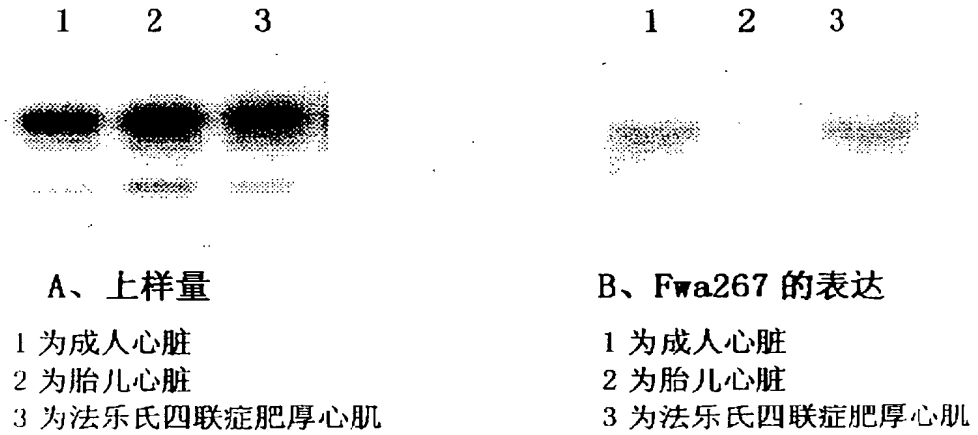
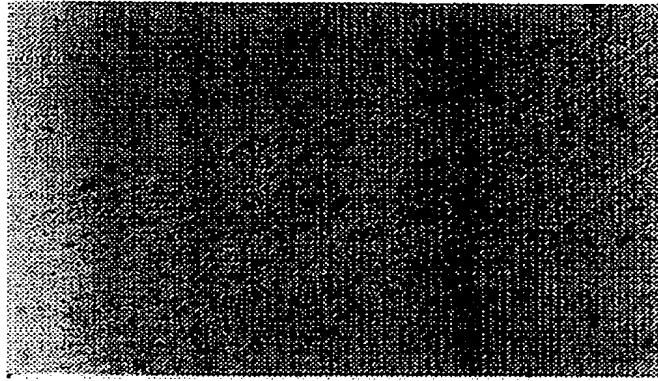
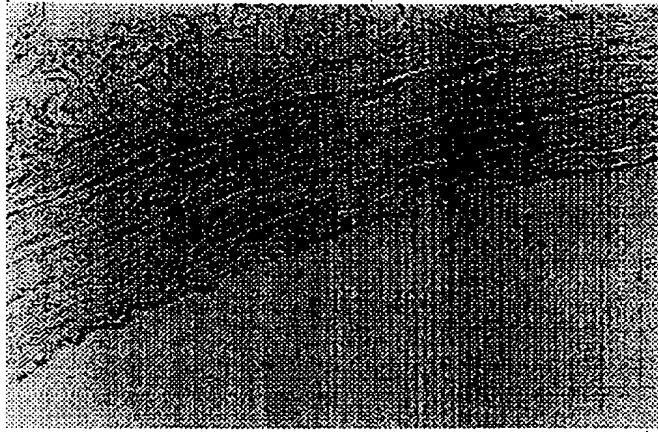


图 5 Fwa267 在成人、胎儿及在法乐氏四联症肥厚心肌细胞中的表达



A 正常动物主动脉

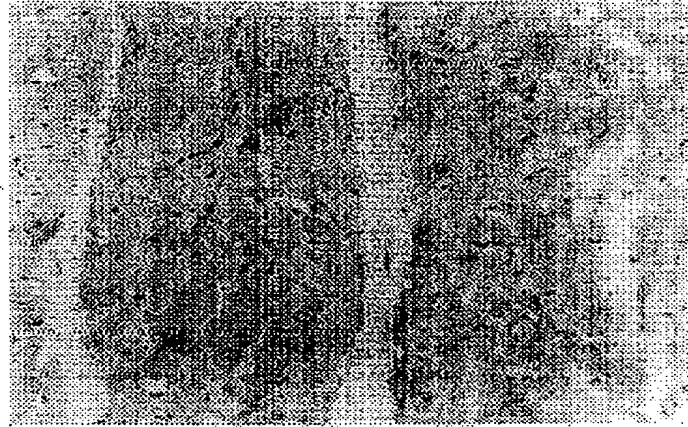


B 亚急性心衰动物主动脉



C 慢性心衰动物心脏组织

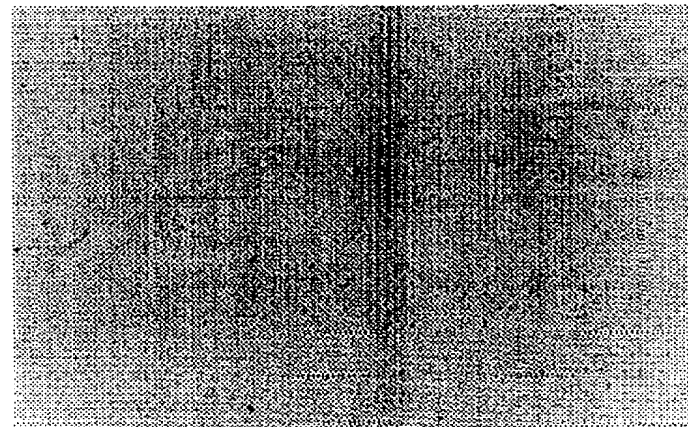
图 6 Fwa267 在正常、亚急性心衰动物主动脉和慢性心衰动物心脏中的表达



A 正常人心肌组织



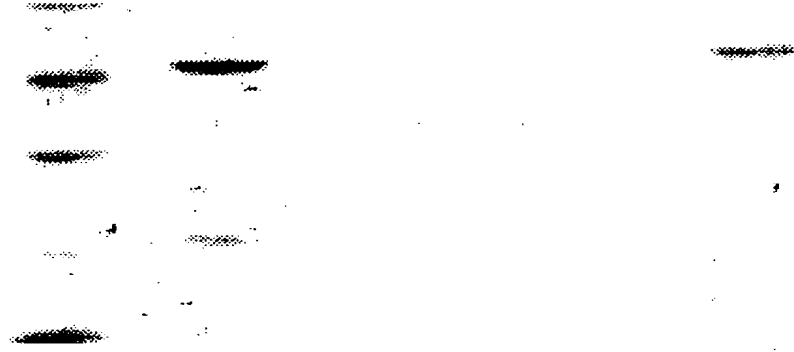
B 心肌梗塞室壁瘤组织



C 心肌梗塞室壁瘤组织 (阴性对照)

图 7 Fwa267 在正常心肌组织和心肌梗塞室壁瘤组织中的表达

43
01.02.21



A、Fwa267 的 SDS—PAGE 电泳

B、Fwa267 蛋白的 Western 印迹杂交

图 8 Fwa267 的蛋白电泳及 Western 印迹杂交